AGRONOMIA LUSITANA

VOL. 18 — N.º 4

1956

ESTAÇÃO AGRONÓMICA NACIONAL

SACAVÉM

PORTUGAL

COMMONWEALTH MYCOLOGICAL
4 NOV 1957

FUNGI LUSITANIAE

XV

Auctore

MARIA ROSÁLIA DE SOUSA DIAS

(STATIO AGRONOMICA NATIONALIS)

INTRODUÇÃO

À memória do querido Prof. MANUEL DE SOUSA DA CAMARA dedicamos o presente trabalho.

Se outro mérito não tiver, ao menos seja-lhe concedido o da homenagem sincera da discípula dos bancos da Escola e de toda a vida profissional ao grande Mestre, a quem do saber tudo deve, ao bom e leal Amigo que, com amarga saudade, tão vivo mantém no espírito e no coração.

Nesta publicação incluem-se duas espécies novas para a ciência micológica e mais quatro ainda não assinaladas no continente lusitano.

Agradecemos ao Departamento de Sistemática da Estação Agronómica Nacional a determinação das plantas hospedeiras. Igualmente ficamos reconhecidos aos diversos Colectores que obsequiosamente nos cederam alguns dos exemplares.

UREDINALES (BRONGN.) DIET.

PUCCINIACEAE SCHRÖT.

Didymosporae SACC.

Puccinia PERS.

P. chondrillina BUB. & SYD., in P. & H. SYDOW, *Monogr. Ured.* 1: 44. 1904; S. CAMARA et al., in *Agron. Lusit.* 1 (4): 115. 1939.

In caulibus *Chondrillae junceae* L., pr. Vilar Formoso (Beira Alta), leg. B. RAINHA, julio, 1955.

Obs.: (II tantum visis) — *uredosporis 23,75-27,5×18-23 μ.*

CRONARTIACEAE DIET.

Endophyllum LÉV.

* 458) ***E. Centranthi-rubri*** POIRAULT, in HARIOT, *Urédinées:* 284. 1908; ex descr. P. & H. SYDOW, *Monogr. Ured.* **3**: 534. 1915; SACCARDO & TROTTER, *Syll.* **23**: 849. 1925: FRAGOSO, *Uredales* **2**: 300. 1925.

In foliis *Centranthi Calcitrapae* (L.) DUF., pr. Torres Novas (Ribatejo), leg. P. SILVA & B. RAINHA, martio, 1955.

Obs.: *teleutosporis 16,5×15-17 μ.*

PYRENIALES (FR.) SACC. & TRAV.

VALSACEAE TUL.

Phaeodidymae SACC.

Valsaria DE NOT. & CES.

* 459) ***V. Spartii*** MAUBL., in *Bull. Soc. Mycol. Fr.* **21**: 88. *t. 6*, fig. II. 1905; ex descr. SACCARDO & TROTTER, *Syll.* **22**: 391. 1913.

In ramulis *Spartii juncei* L., pr. Sacavém (ad Hortum Stationis Agronomicae Nationalis), leg. MARIA. R. S. DIAS, januario, 1955.

Obs.: *ascis 112,5-125×10-12,5 μ; sporidiis 15,5-20×7,5-9,5 μ.*

Sociis *Massariella Camarae* n. sp. et *Lophiosphaera Camarae* n. sp..

SPHAERIACEAE (FR.) SACC.

Phaeodidymae SACC.

Massariella SPEG.

** 460) ***M. Camarae*** **n. sp.** (Tab. I, fig. 1).

Peritheciis sparsis vel laxe gregariis, tectis, clypeatis, orbicularibus, majusculis, ostiolatis, atrobrunneis, 490-530×300-450 μ; ascis cylindraceis, aparaphysatis, sessilibus, octosporis, 158,6-182×13--18,2 μ; sporidiis monostichis, ellipsoideis, utrinque attenuatis, rectis curvulisve, 1-septatis, loculis subaequalibus, constrictis, striatis, brunneis, strato hyalino obvolutis, 26-28,6×11,7-14,3 μ.

In ramulis *Spartii juncei* L., pr. Sacavém (ad Hortum Stationis Agronomicae Nationalis), leg. MARIA R. S. DIAS, januario, 1955.

Sociis *Valsaria Spartii* MAUBL. et *Lophiosphaera Camarae* n. sp..

Clarissimo et desideratissimo Magistro, scientiae mycologicae solertissimo cultori, EMMANUEL DE SOUSA DA CAMARA, speciem hanc novam dicavi.

Didymosphaeria FUCK.

* 461) ***D. Idaei*** FELTG., in *Rec. Soc. Bot. Luxemb.* **15**: 172. 1901; ex descr. SACCARDO, *Syll.* **17**: 677. 1905.

In ramulis siccis *Rubi Idaei* L., pr. Azeitão, leg. AMARILIS MENDONÇA, martio, 1955.

Obs.: *peritheciis 175-230 × 125-175 μ; ascis 60-67,5 × 8,75-10 μ; sporidiis 10-13 × 5-6,25 μ.*

LOPHIOSTOMATACEAE SACC.

Hyalodidymae SACC.

Lophiosphaera TREV.

** 462) ***L. Camarae*** **n. sp.** (Tab. I, fig. 2).

Peritheciis sparsis, quandoque binis aproximatis, subglobosis vel ellipsoideis, forte rostratis, atris, 400-570 × 290-370 μ, ostiolo apice compresso-truncato, 100-195 μ longis; ascis clavatis, stipitatis, copiose paraphysatis, 87,5-106,25 × 12,25-13 μ; sporidis distichis vel subdistichis, elliptico-fusoideis, rectis curvulisve, 1-septatis, medio leniter constrictis, hyalinis, inicio 4 guttulatis, 23-28,75 × 4,5-5,5 μ.

In ramulis *Spartii juncei* L., pr. Sacavém (ad Hortum Sationis Agronomicae Nationalis), leg. MARIA R. S. DIAS, januario, 1955.

Sociis *Valsaria Spartii* MAUBL. et *Massariella Camarae* n. sp..

Clarissimo et desideratissimo Magistro, scientiae mycologicae solertissimo cultoris, EMMANUEL DE SOUSA DA CAMARA, species haec nova dicatur.

HYSTERIALES (CRD.) SACC. & TRAV.

HYSTERIACEAE CRD.

Phaeodictyae SACC.

Hysterographium CRD.

H. Fraxini (PERS.) DE NOT., ex descr. P. A. SACCARDO, *Syll.* **2**: 776. 1883; S. CAMARA, in *Agron. Lusit.* **9** (2): 97. 1947.

In ramis siccis *Oleae europaea* L., pr. Oeiras (Quinta do Marquês), leg. MARIA R. S. DIAS, majo, 1955.

Obs.: *peritheciis 650-840 × 450-530 μ; ascis 175-210 × 22,5-30 μ; sporidiis 34,5-39 × 15,5-17,5 μ.*

Socia *Cytospora oleina* BERL..

SPHAEROPSIDALES (LÉV.) LIND.

SPHAERIOIDACEAE SACC.

Hyalosporae SACC.

Cytospora EHRB.

C. oleina BERL., ex descr. SACCARDO, *Syll.* **11**: 509. 1895; S. CAMARA, in *Agron. Lusit.* **11** (1): 51. 1949.

In ramis siccis *Oleae europaeae* L., pr. Oeiras (Quinta do Marquês), leg. MARIA R. S. DIAS, majo, 1955.

Obs.: *sporulis allantoideis 4-5 × 1-1,5 μ.*

Socio *Hysterographio Fraxini* (PERS.) DE NOT..

Phomopsis SACC.

Ph. depressa (LÉV.) TRAV., *Pyren.* in *Fl. Ital. Cryptog.*: 272. 1906; S. Camara, in *Agron. Lusit.* **10** (4): 301 n. 421. 1948.

Ad ramulos *Syringae vulgaris* L., in Benavente, leg. MARIA R. S. DIAS, majo, 1955.

Obs.: *pycnidiis 170-250 × 90-200 μ; sporophoris majoribus, 19-22 μ longis; sporulis 7,5-9,5 × 2,5-3 μ.*

Socia *Diplodia Lilacis* WEST..

Ph. Gnidii (BRUN.) M. T. LUCAS & S. CAM., in *Agron. Lusit.* **14** (3): 211. 1952 — *Phoma Gnidii* BRUN., *Suppl. Sphaerioid.*: 2. 1887 (n. v.); ex descr. SACCARDO, *Syll.* **10**: 155. 1892; ALLESCHER, in WINTER, *Die Pilze* **6**: 204. 1901.

In ramulis *Daphnes Gnidii* L., pr. Oeiras (Quinta do Marquês), leg. MARIA T. LUCAS, septembri, 1956.

Obs.: *pycnidiis 300-450 × 140-200 μ; sporophoris 13,75-20 × × 1,5-2 μ; sporulis 7,5-8,75 × 2-2,5 μ.*

Socia *Diplodia Laureolae* FAUTR. f. *Mezerei* FERR..

Sirococcus PREUSS.

S. rhabdosporoides S. CAM., in *An. Inst. Sup. Agron.* 3: 56, n. 113. 1929 *(« Rhabdosporoides »).*

Ad ramulos emortuos *Persicae vulgaris* MILL., in Benavente, leg. MARIA R. S. DIAS, martio, 1956.

Obs.: *pycnidiis 280-350 × 240-340 μ; sporulis 3-5,5 × 2,5-3 μ; catenulas 30-80 × 2,5-3 μ.*

Phaeodidymae SACC.

Diplodia FR.

* 463) ***D. Laureolae*** FAUTR., **f. Mezerei** FERR., in *Ann. Mycol.* **10** (3): 290. 1912; TROTTER & al., in SACCARDO, *Syll.* **25**: 292. 1931.

In ramulis *Daphnes Gnidii* L., pr. Oeiras (Quinta do Marquês), leg. MARIA T. LUCAS, septembri, 1956.

Obs.: *pycnidiis 300-480 × 220-380 μ; sporulis 22,5-25 × 10--11,5 μ.*

Socio *Phomopsi Gnidii* (BRUN.) M. T. LUCAS & S. CAM..

* 464) ***D. Lilacis*** WEST., in *Bull. Ac. Brux.* **3**: 119. 1852 (n. v.); ex descr. SACCARDO, *Syll.*, **3**: 346. 1884; ALLESCHER, in WINTER, *Die Pilze* **7**: 165. 1903 — *D. Syringae* AUERSW., in FUCKEL, *Symb. Mycol.*: 395. 1869 (n. v.); GROVE, *Brit. St. Leaf-Fungi* **2**: 60. 1937.

Ad ramulos *Syringae vulgaris* L., in Benavente, leg. MARIA R. S. DIAS, majo, 1955.

Obs.: *pycnidiis 235-380 × 140-270 μ; sporophoris 6,25-7,5 × × 3,75-5 μ; sporulis 17,5-25 × 8,75-11,5 μ.*

Socio *Phomopsi depressa* (LÉV.) TRAV..

Scolecosporae SACC.

Septoria FR.

S. Petroselini DESM., ex descr. SACCARDO, *Syll.* **3**: 530. 1884; S. CAMARA in *Agron. Lusit.* **9** (2): 117. n. 362. 1947.

In foliis *Petroselini sativi* HOFFM., pr. Amadora, leg. MARIA R. S. DIAS, majo, 1956.

Obs.: *pycnidiis 52,5-97,5 × 17,5-28 μ; sporulis 26-35 × 1,25-2 μ.*

S. Polygoni S. CAM., in *Agron. Lusit.* **9** (2): 118-119. *t. II*, fig. 4 et 10. 1947.

In foliis *Polygoni lapathifolii* L., pr. Amorim (Póvoa de Varzim), leg. MARIA L. BORGES, junio, 1956.

Obs.: *pycnidiis 70-120 × 60-105 μ; sporulis 27,5-52,5 × 1,25-3 μ.*

MELANCONIALES (CRD.) SACC. & TRAV.

MELANCONIACEAE (CRD.) SACC. & TRAV.

Hyalosporae SACC.

Colletotrichum CRD.

C. gloeosporioides PENZ., ex descr. SACCARDO, *Syll.* 3: 735. 1884; MARIA R. S. DIAS & S. CAMARA, in *Agron. Lusit.* **14**: 121. 1952.

In foliis *Citri Aurantii* L., pr. Benavente, leg. MARIA R. S. DIAS, martio, 1956.

Obs.: *acervulis 220-480 × 80-130 μ; setulis 46-77,5 × 3,5-5 μ; conidiis 14-23 × 5-5,5 μ.*

Socio *Epicocco vulgari* CRD..

HYPHALES (MART.) SACC. & TRAV.

TUBERCULARIACEAE EHRB.

Amerosporae SACC.

Epicoccum LINK

E. vulgare CRD., ex descr. SACCARDO, *Syll.* 4: 737. 1886; MARIA T. LUCAS & S. CAMARA, in *Agron. Lusit.* **17** (2-3): 133. 1955.

In foliis *Citri Aurantii* L., pr. Benavente, leg. MARIA R. S. DIAS, martio, 1956.

Obs.: *conidiis 12,5-22,5 × 10-20 μ.*

Socio *Collectotricho gloeosporioide* PENZ..

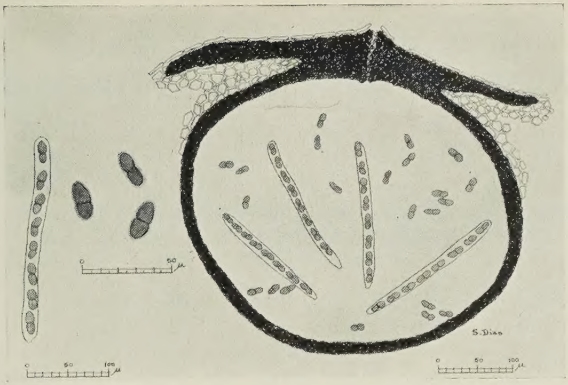


Fig. 1

Fig. 2

Digitized by the Internet Archive
in 2025

https://archive.org/details/agronomia-lusitana_1956_18_4

KARYOTYPIC VARIATION IN PTERIDOPHYTA AND THEIR SIGNIFICANCE

BY *ARUN KUMAR SHARMA* AND *ARATI MAJUMDAR*
(Cytogenetics Laboratory, Botany Department, Calcutta University)

IN the group Pteridophyta, it has been well exemplified through the excellent works of MANTON (1950) that polyploidy supplemented by apogamy and apospory plays a significant role in evolution. Chromosome numbers, as high as 1262 (ABRAHAM & NINAN, 1954) have been reported in species of ferns, indicating the prominent role played by polyploidy in the origin of varied forms.

The method of speciation in Pteridophyta is no doubt to some extent different from that of the higher plants in the sense that an additional and very effective means is provided in the former through apogamy and apospory. It must be admitted that the phenomena of apogamy and apospory, as they are, cannot be considered as playing a direct role in speciation. The origin of new characters is not effected, though their importance in stabilization of polyploids cannot at all be ignored.

While dealing with cytology of a number of Pteridophytes, certain interesting facts have become clear, which we consider, are of fundamental significance. In species such as *Pteris ensiformis* and *Adiantum Capillus-Veneris,* chromosomes have been studied from root-tip and sporogenous cells involving the standard technique of MANTON as well as with pretreatment in 0.01 % colchicine for orcein staining of meiotic chromosomes, and aesculine method (SHARMA & SARKAR, 1955) for somatic chromosomes. The cytological peculiarity is markedly demonstrated in the absence of regularity in the root-tip cells and to some extent even in the sporogenous cells. No regularity was found in the number of chromosomes involved in the variation and as such, widely different chromosome numbers have been recorded in different nuclei. Attempts are now

being given to find out whether any particular zone can be traced where the abnormality occurs in maximum frequency. For example, in *Pteris ensiformis* the chromosome numbers determined in the somatic tissue vary from 19 to 88. Not only the numerical alterations but at the same time structural alterations too are also not of infrequent occurrence. In the sporogenous cells too, the variations are similarly present.

The numbers of chromosomes in the variant nuclei so far encountered, are not necessarily the same in both sporogenous and root-tip cells. Thirty-three has been found to be the only number occurring in both. Under the circumstances, it is very difficult to state precisely the normal chromosome number of the species for which a thorough investigation has already been undertaken.

In case of *Adiantum Capillus-Veneris* the variations in the root-tips noted vary from 9 to 70. During meiosis no irregularities were noted and the spore mother cells were all found to contain 30 bivalents. This seems to be the regular number for the species.

Such irregular behaviour of chromosomes have recently been noted in a number of vegetatively propagating Angiosperms in this laboratory and the reports have been made from time to time (SHARMA, 1955, 1957; SHARMA & DAS, 1954; SHARMA & BHATTACHARYYA, 1954; SHARMA & BAL, 1954; SHARMA & DE, 1955; SHARMA & SHARMA, 1956; MOOKERJEA, 1955, a, b). Such karyotypic alterations have been suggested as having a profound role in the origin of species, through their entrance into the growing tip of the daughter shoot. Recently similar type of behaviour has been reported in *Pteris longifolia* by SHARMA & MAJUMDAR (1955).

The occurrence of such karyotypic alterations in the somatic tissue, as the present investigation reveals, may also indicate their similar significance in Pteridophyta for which detailed investigations are in progress.

REFERENCES

ABRAHAM, A. & NINAN, C. A.
1954 The chromosomes of *Ophioglossum reticulatum* L. *Curr. Sci.* **23**: 213-214.
MANTON, I.
1950 *Problems of cytology and evolution in the Pteridophyta.* Cambridge Univ. Press, Cambridge.

MOOKERJEA, ARCHANA

1955a Cytology of amaryllids as an aid to the understanding of evolution. *Caryologia.* **7**: 1-71.

1955b Cytology of different species of aroids with a view to trace the basis of their evolution. *Caryologia.* **7**: 221-291.

SHARMA, A. K.

1955 Cytology of some of the numbers of *Commelinaceae* and its bearing on the interpretation of phylogeny. *Genetica.* **27**: 323-363.

1957 A new concept of a means of speciation in plants. *Caryologia* **9** (2), in press.

——————— & BAL, A. K.

1954 A cytological study of a few genera of *Amaryllidaceae* with a view to finding out the basis of their phylogeny. *Abst. Proc. 41st Ind. Sci. Congr.:* 148.

——————— & BHATTACHARYYA, N. K.

1954 An investigation of the karyotype of the genus *Crinum* and its phylogeny. *Abst. Proc. 41st Ind. Sci. Congr.:* 147.

——————— & DAS, N. K.

1954 Study of karyotypes and their alterations in aroids. *Agron. Lusit.* **16**: 23-48.

——————— & DE, D.

1955 Polyploidy in *Dioscorea. Abst. Proc. 42nd Ind. Sci. Congr.:* 248-249.

——————— & MAJUMDAR, ARATI

1955 Cytological peculiarity of *Pteris longifolia* L.. *Science & Culture* **21**: 338--339.

——————— & SARKAR, S. K.

1955 A new technique for the study of chromosomes of palms. *Nature* **176**: 261-262.

——————— & SHARMA (née MOOKERJEA), ARCHANA

1956 Fixity in chromosome number of plants, *Nature* **177**: 335-336.

EXPLANATION OF FIGURES

Figs. 1 & 3 — Somatic metaphase plates of *Pteris ensiformis* showing 33 and 33 chromosomes respectively with two different karyotypes. Chromosome A noted in Fig. 1 is absent in the other.

Fig. 2 — Somatic metaphase plate of *P. ensiformis* showing 78 chromosomes.

Figs. 4-6 — Meiotic stages of *P. ensiformis* showing 33, 55 & 77 chromosomes respectively.

Figs. 7-9 — Somatic metaphase plates of *Adiantum Capillus-Veneris* showing 16, 60 & 70 chromosomes respectively.

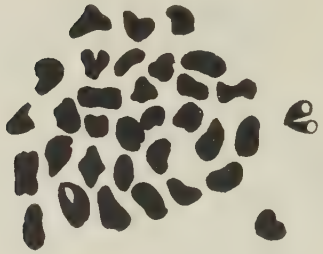
Fig. 10 — Meiotic metaphase plate of *A. Capillus-Veneris* showing 30 chromosomes.

(× 2200 approxly)

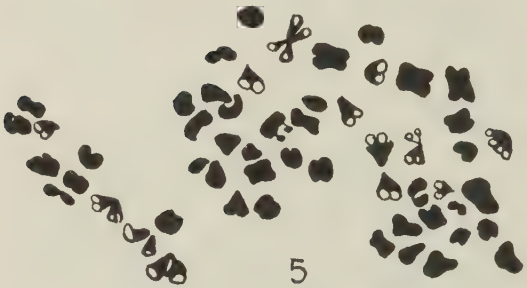
1

2

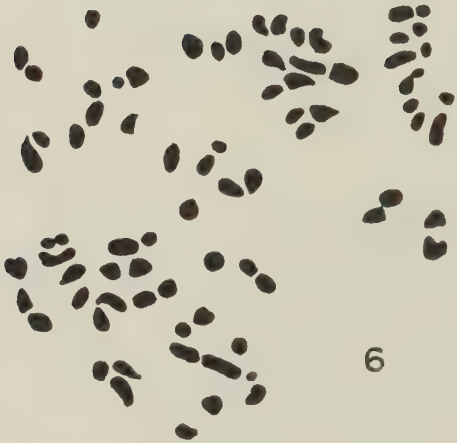
3



4



5



6

7

10

9

8

SECONDARY CENTRIC ACTIVITY IN AN HYBRID OF *TRITICUM* AND *ÆGILOPS*

BY *M. NORONHA-WAGNER*
(Estação Agronómica Nacional)

A centric activity, localised in a chromosome region other than the centromeric one, has been reported by some authors namely PRAKKEN & MÜNTZING (1942) and ÖSTERGREN & PRAKKEN (1946) in rye, RHOADES & VILKOMERSON (1942) and RHOADES (1952) in corn, VILKOMERSON (1950) in *Elymus Wiegandii*, WALTERS (1952 a, 1952 b) in two interspecific hybrids of *Bromus* and ZOHARY (1955) in *Lilium formosanum*.

PRAKKEN & MÜNTZING (1942) have called this special behaviour « T-phenomenon », RHOADES & WILKOMERSON (1942) described it as « secondary centric activity » and later RHOADES (1952), as « neo--centric regions ».

We will adopt the term « secondary centric activity » to describe a similar behaviour found by us in two chromosomes of *Ægilops* which were added to the genome of *Triticum*.

An artificial allopolyploid of *Triticum dicoccoides* KÖRN. and *Ægilops umbellulata* ZHUK. (1) was twice backcrossed to its parent *Triticum*. The seeds obtained of the second backcross were put to germinate in petri dishes in order to count their chromosome numbers. Some plants with 2n = 30 chromosomes (28 of *Triticum dicoccoides* and 2 of *Ægilops umbellulata*) were afterwards transferred to the field. One of these plants has shown « secondary centric activity » only in the two non-homologous chromosomes of *Ægilops umbellulata*. The other plants with 2n = 30 chromosomes may present, probably, the same phenomenon but their meiosis was not studied.

---

(1) We wish to express our gratitude to Dr. E. R. Sears (Columbia, Missouri) who was kind enough to furnish this allopolyploid.

Spikes excised from flowering culms were fixed in Carnoy (6:3:1) and transferred to 70 per cent alcohol. Anthers of this material were smeared in aceto-orcein and furnished the PMC studied.

In this paper only the observations made in meiosis of a single plant with 28 chromosomes of *Triticum dicoccoides* and 2 chromosomes of *Ægilops umbellulata* are presented.

In the first metaphase the chromosomes of *Triticum* form, quite regularly, 14 bivalents and the chromosomes of *Ægilops* are seen, always, as 2 univalents (Fig. 1). Early first anaphase shows

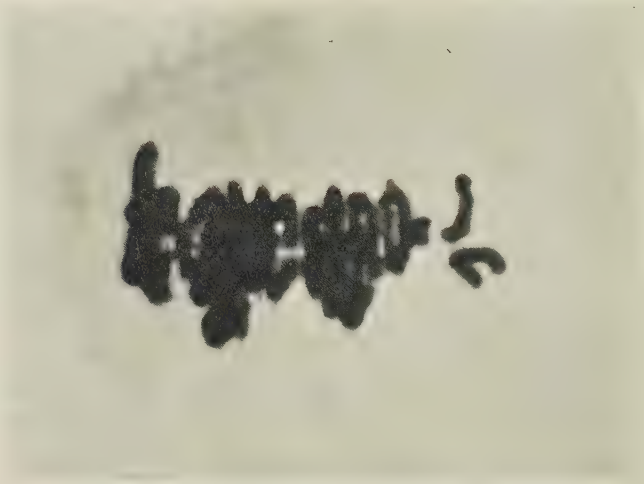


Fig. 1

the normal picture in these hybrids, *i.e.* the members of the bivalents going towards opposite poles and the univalents lying in the equatorial plate. These two univalents divide always in the first anaphase and it is possible to distinguish one from the other by the position of their primary centromeres; one of these univalents has its centromere localised in a sub-median position whereas in the other it is located sub-terminaly (Pl. I A, B).

The bivalents of *Triticum* behave normally through the whole anaphase their members being pulled towards opposite poles by centromeres localised either in a sub-median or sub-terminal position.

The two lagging chromosomes of *Ægilops* present a quite irregular behaviour. Some times their true centromeres do not function becoming unable to carry the chromatids towards the poles, the centromeric activity being then taken over by a «secondary centric» one (Pl. I A, B, C, D; Pl. II A, B, C, D; Pl. III B, C, D). This phenomenon is observed either in both lagging chromosomes (Pl. I C) or in only one of them (Pl. I A, B, D; Pl. II A, B, C, D; Pl. III C, D). In the last case the other univalent behaves normally its chromatids being pulled to the poles by their primary centromeres. In most cases, in the univalent chromosomes one end grows active, when the primary centromere does not function, each chromatid then moves towards opposite poles pulled by that end; in a few cases we have seen both ends of a chromatid being active, its sister chromatid remaining perpendicular to the equatorial plate owing to the activity of only one of its ends (Pl. I C, D; Pl. II A). Other times both ends of each chromatid show themselves active. In one of the ends the « secondary centric activity» seems always stronger than in the other one (Pl. II B, C). Apparently the weaker end does not play an important role on chromatid movement; we think that perhaps the «secondary centric activity», on the weaker ends, only succeeds in pulling apart slightly one of the ends from the other. When the «secondary centric activity» is only localised in one of the univalent ends, the chromatids form bridge-like configurations (Pl. I B; Pl. II D; Pl. III D).

So far as we know from the behaviour of the heterobrachial univalent it is not the same chromosome end that always becomes active by lack of primary centromeric activity. As a matter of fact either chromosome ends may become active and when the «secondary centric activity» is located at both ends either of them may be the strongest. In the other, almost isobrachial, univalent it is very difficult to distinguish which arm has the «secondary centric activity». Seldom we found one chromatid moving towards the pole led by its true centromere the other one being moved to the opposite pole by the action of the «secondary centric activity». Only once we observed all four chromatids, of the two univalents, but one, behaving normally, that is, being pulled by their primary centromeres, one apparently inert chromatid remaining in the equatorial plate showing neither primary nor «secondary centric activity» (Pl. III A).

From observations carried out on this material we can draw the conclusion that the centromere is present in the two univalents; however, its normal function can some times be taken over by a « secondary centric activity » located at the distal ends. The reasons for which the primary centromere is inactivated as well as the causes that lead the ends to become active are yet unknown. Nevertheless there are two points of remarkable interest that will be studied later:

1. the centromeres of both univalents were never seen to behave normally and simultaneously.
2. the two univalents which are able to acquire « secondary centric activity » are non-homologous chromosomes of *Ægilops umbellulata* surrounded by a cytoplasm which is almost derived from *Triticum*.

SUMÁRIO

Apresentam-se algumas observações sobre o comportamento, na primeira divisão meiótica, de dois cromosomas não-homólogos de *Ægilops umbellulata* que foram adicionados ao genómio de *Triticum dicoccoides*. Verificou-se que estes cromosomas possuem um centrómero primário capaz de desempenhar a sua função a qual, porém, é, algumas vezes, substituída por uma acção centromérica secundária localizada nos extremos distais. Não se pode, ainda, apresentar nenhuma explicação para este fenómeno mas aponta-se o sentido em que serão orientadas futuras investigações que julgamos poderem não só lançar alguma luz sobre a origem deste caso como também, possivelmente, sobre o modo de funcionamento do centrómero.

LITERATURE CITED

ÖSTERGREN, G. & PRAKKEN, R.
1946 Behavior on the spindle of the actively mobile chromosome ends of rye. *Hereditas* **32**: 473-494.

PRAKKEN, R. & MÜNTZING, A.
1942 A meiotic peculiarity in rye, simulating a terminal centromere. *Hereditas* **28**: 441-482.

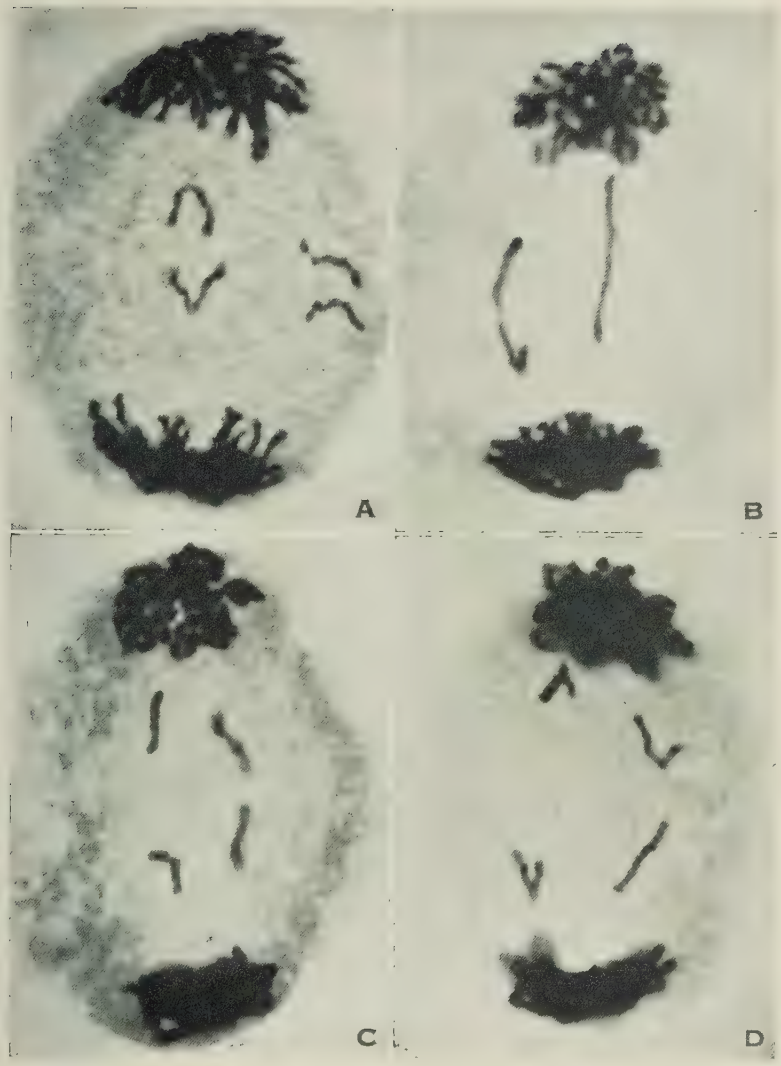
RHOADES, M. M.
1952 Preferential segregation in maize. In *Heterosis*, edited by J. W. Gowen, Iowa State College Press, Ames, Iowa: 66-80.

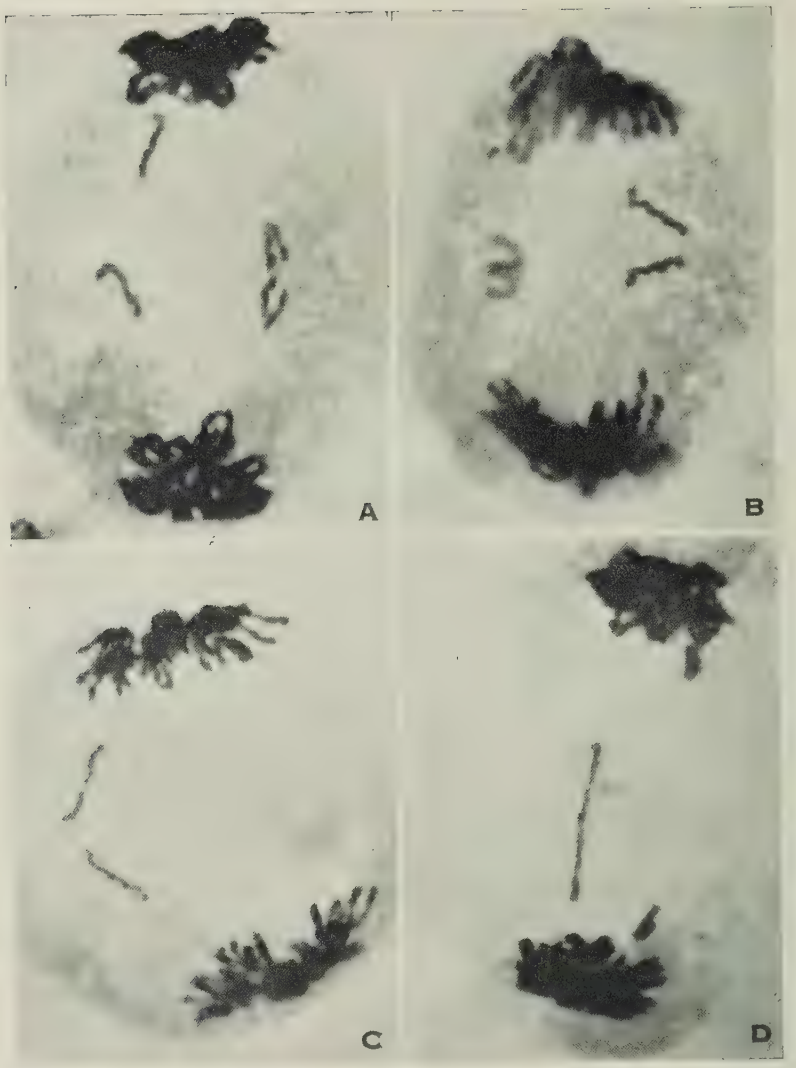
RHOADES, M. M. & VILKOMERSON, HILDA
1942 On the anaphase movement of the chromosomes. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, Wash. **28**: 433-436.

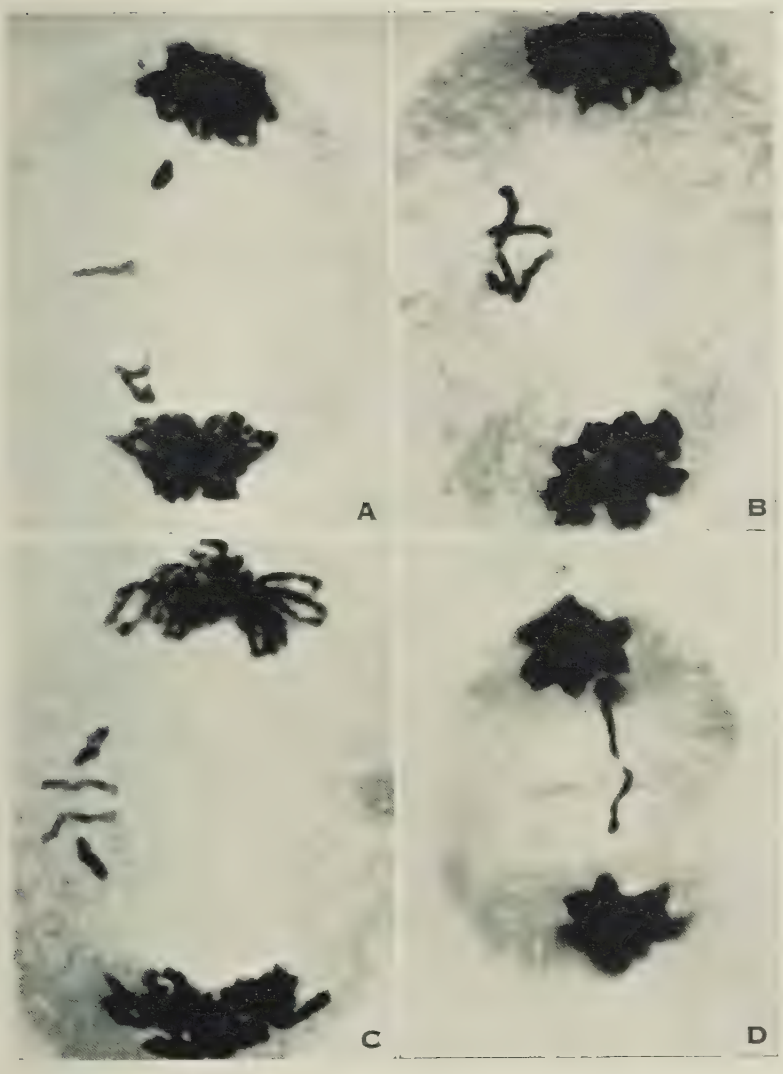
VILKOMERSON, HILDA
1950 The unusual meiotic behavior of *Elymus Wiegandii*. *Exp. Cell Res.* **1**: 534-542.

WALTERS, MARTA S.
1952a Spontaneous chromosome breakage and atypical chromosome movement in meiosis of the hybrid *Bromus marginatus* × *B. pseudolaevipes*. *Genetics* **37**: 8-25.
1952b Atypical chromosome movement in meiotic anaphase of *Bromus pitensis* × *B. marginatus*. *Amer. J. Bot.* **39**: 619-625.

ZOHARY, D.
1955 Secondary centric activity in *Lilium formosanum*. *Amer. Nat.* **89**: 50-52.


A
B
C
D


A
B
C
D


A
B
C
D

MALE STERILITY IN PALMS

BY *SANTOSH KUMAR SARKAR*
(Cytogenetics Laboratory, Botany Department, Calcutta University)

INTRODUCTION

In a previous paper while dealing with the cytology of different Palm genera, considerable meiotic irregularities were recorded (SHARMA & SARKAR, 1956). They were noted in practically all the species so far investigated. Furthermore, on the basis of corroborative data, it has been suggested in a previous communiqué by SHARMA & SARKAR (1956) that the sexual reproduction is not of absolute necessity of Palms for the purpose of propagation and fruit production. The presence of considerable male sterility had to be suggested.

As is well known, meiotic irregularities result into varying types of grains causing sterility. A confirmation was deemed desirable as regards the position of male sterility in Palms. In order to have a correct understanding of this issue, thorough investigation on the type of pollen grains and their capacity of germination seemed necessary. The present report deals with the percentage of different types of pollen grains, their germination capacity in artificial medium and on the stigma and a correlation of these features with meiotic irregularities. It will be seen that the data presented in the following paper strongly indicate a high percentage of male sterility in Palms and thus relatively less importance of sexual reproduction in the continuation of their life cycle.

MATERIALS AND METHODS

Materials

Twenty-eight species belonging to twenty-three genera of Palms were used for the present investigation. The majority of them were available in the Indian Botanic Gardens (formerly the

Imperial Botanic Gardens) at Sibpur, Calcutta, and the rest in the Botanic Gardens of the Calcutta University. A list of the materials from which flowers were collected is given in the Table I.

Methods

1. *The method of counting the deformed and the empty pollens*

i. Pollens were dusted on a glass slide in a drop of 1 % aceto-carmine and covered gently by means of a cover glass. It was sealed with paraffin wax and observed under the miscroscope for counting the percentage of deformed and empty pollens. Percentage was calculated from a large number of slides.

ii. In addition to this, another procedure (WODEHOUSE, 1935) was also followed to study the pollen grains. A small amount of pollen was placed at the centre of a dry slide and a drop of absolute alcohol was added and allowed to evaporate partly. The alcohol at the time of evaporation left the oily and resinous substances of the pollen deposited in a ring around the specimen. The oily ring was wiped off with cotton moistened with alcohol and before the specimens had time to dry up completely, a drop of hot, melted *methyl green glycerine jelly* was added. The pollens were then stirred in with a needle and evenly distributed. It was covered by means of a cover glass and sealed for observation.

2. *Preparation of the artificial medium (SWANSON, 1940) and the procedure for the study of artificial germination of pollen grains*

0.5 g agar, 2.0 g cane sugar and 25 cc water were taken in a small beaker and boiled for a few minutes and then 0.5 g gelatine was added to it. The whole mass was stirred well by means of a glass rod.

A thin layer of this medium when hot was spread over a glass slide by means of a glass rod. Pollen grains were then dusted. The slide was then kept in a moist chamber for the purpose of counting the percentage of ungerminated grains in the next day. This slide was observed under a microscope and, in each field, number of germinated and ungerminated grains were counted. The percentage was calculated from a large number of slides prepared.

Pollens were taken from the flowers, in the very day of anthesis,

in the second and the third day after anthesis and the experiment was carried on separately in each case to compare the percentage of ungerminated grains in one case with that of the other. Only three species, viz., *Actinophloeus Macarthurii, Areca triandra* and *Chrysalidocarpus lutescens* were found to be convenient for carrying out this study which has been shown in Table IV.

The experiment on germination of pollens on this artificial medium was performed in the rainy season as well as in the winter to compare the percentage of germination in the two seasons (vide Table III).

3. *Procedure for counting germinated and ungerminated pollen grains on their own stigma*

When the stigma after opening of the flowers on examination was found to be sticky and thus fully receptive, pollens from flowers after anthesis were dusted on it. On the next day, the stigma with the style region was cut and placed on the slide and thus loose pollens which were lying on the stigmatic surface were counted. This procedure was adopted to find out the exact number of pollen grains lying on the stigmatic surface, a large number of which had every possibility of being washed off during staining. Next, two fine slits were made on the style region with a sharp scalpel. After scalding thirty to forty-five seconds at 70°-75° C and immersing six to eight hours in 50 % — alcohol containing equal proportions of 6 % formaline, the cortex of the style was removed. The material was stained for twenty-four hours in a mixture of eight parts of 1 % aqueous acid fuchsin and two parts of 1 % light green (aqueous or alcoholic) following the technique of BUCHHOLZ (1931). The strands of tissue became clear after keeping the material overnight in 80 % lactic acid. The material was then carefully smeared on a glass slide and mounted in pure lactic acid under the cover glass which was sealed by paraffin wax. Then the percentage of germinated grains were counted.

4. *To detect empty anthers and deformed mother cells*

Empty anthers without any pollens, anthers with only a few pollens and deformed mother cells were detected in some cases (vide Table V) when observed after smearing in 2 % aceto-carmine.

5. *Types of meiotic irregularities considered as relevant for showing correlation with pollen sterility*

For correlating pollen sterility with meiotic irregularities, types of abnormalities, viz., nondisjunction, lagging, unequal separation, inversion bridge with fragment, early separation, formation of pentads, hexads etc. with cells of unequal size and absolutely crumpled mother cells were taken into consideration. These irregularities were counted from temporary and permanent preparations.

OBSERVATIONS

1. The following table shows the data on irregularities in meiosis, percentage of deformed pollens, percentage of empty pollens and percentage of ungerminated pollens on a standard medium.

TABLE I

Number and name of species	Different types of irregularity in meiosis	Percentage of irregularities in meiosis	Percentage of sterile pollens when considered their:		
			size & shape (% of deformed pollens)	Contents (% of empty pollens)	germination capacity on standard medium (% of ungerminated pollens)
1. *Pritchardia pacifica*	Lagging univalents, tetrads with unequal cells	14	5	3.3	22.3
2. *Licuala grandis*	Lagging of univalents	11	6.4	4	29
3. *L peltata*	Nondisjunction	16.5	9	2	37.2
4. *Livistona chinensis*	Unequal number of chromosomes in two nuclei at second metaphase, pentads with unequal cells	8	3.5	1.5	25.4
5. *Thrinax barbadensis*	Inversion bridge with fragment	22.3	12.5	2.4	32

TABLE I *(Contd.)*

6. *Rhapis flabelliformis*	Lagging univalents, unequal distribution of chromosomes in two nuclei at second metaphase, tetrads with unequal cells	30	20	3	45
7. *Corypha elata*	Unequal number of chromosomes in two nuclei in second metaphase	7	6.1	1.2	24.5
8. *Sabal Adansonii*	Early separation, unequal distribution of chromosomes in two nuclei in second metaphase	4.7	2	0.5	21
9. *Latania Commersonii*	Lagging bivalents, unequal number of chromosomes in two nuclei in second metaphase	10.2	4.3	1.0	31.7
10. *Borassus flabellifer*	Early separation, octads and micronucleus	5	2.2	0.9	26
11. *Calamus Rotang*	Unequal separation of chromosomes in first anaphase	13	7.6	1.8	41
12. *C. arborescens*	Unequal number of chromosomes in two different nuclei in second metaphase	15.4	6	1.3	29.1
13. *Areca Catechu*	Nondisjunction, lagging bivalents, lagging univalents, pentads with cells of unequal size	5.2	3.1	0.5	15.8
14. *A. triandra*	Different number of chromosomes in two different nuclei in second metaphase	22.9	8	4.1	38.5
15. *Dictyosperma album*	Inversion bridge with fragment	3	2	0.98	23.3
16. *Chrysalidocarpus lutescens*	Nondisjunction, reduction of chromosome number in first metaphase, irregular separation, lagging, hexads, heptads	28.5	17.7	6	42.4

TABLE I *(Contd.)*

17. *Actinophloeus Macarthurii*	Unequal number of chromosomes in two different nuclei in second metaphase	11.4	4.3	2	27.7
18. *Oncosperma filamentosum*	Lagging	7.3	3	1.9	33.1
19. *Oreodoxa regia*	Nondisjunction, unequal number of chromosomes in two nuclei in second metaphase, pentads with cells of unequal size	16	9.5	3.6	38.6
20. *Howea Forsteriana*	Unequal number of chromosomes in two different nuclei in second metaphase	12.1	5	1	26.4
21. *Heterospathe elata*	Unequal separation in first anaphase	4	2	1.2	22.9
22. *Dypsis madagascariensis*	Lagging, pentads	10	5.9	2.9	31.5
23. *Arenga saccharifera*	Lagging	8.6	4.7	1.5	28.4
24. *Caryota mitis*	Reduced number of chromosomes in first metaphase, inversion bridge with fragment, lagging univalents, unequal chromosome distribution in second metaphase	13.9	17.2	6	36
25. *Cocos nucifera*	Unequal number of chromosomes in two different nuclei in second metaphase, hexads	4.5	1.5	0.66	12
26. *C. schizophylla*	Lagging bivalents	9	3	1.3	19.7
27. *Phoenix sylvestris*	Deformed mother cells	11.2	8	2	17
28. *P. rupicola*	Pentads	10	5.9	3.1	15.4

Considerable difficulties were encountered in securing the percentage of meiotic irregularities because of the scarcity of mother cells, being even one in some loculi.

TABLE II

Name of species	Percentage of ungerminated pollen grains over stigma in the winter season
Actinophloeus Macarthurii	70 %
Areca triandra	65 %
Chrisalidocarpus lutescens	95 %

TABLE III

Name of species	Percentage of ungerminated pollen grains on the standard medium in different seasons	
	Rainy season July-August	Winter season November-December
Actinophloeus Macarthurii	42 %	25 %
Areca triandra	60 %	40 %

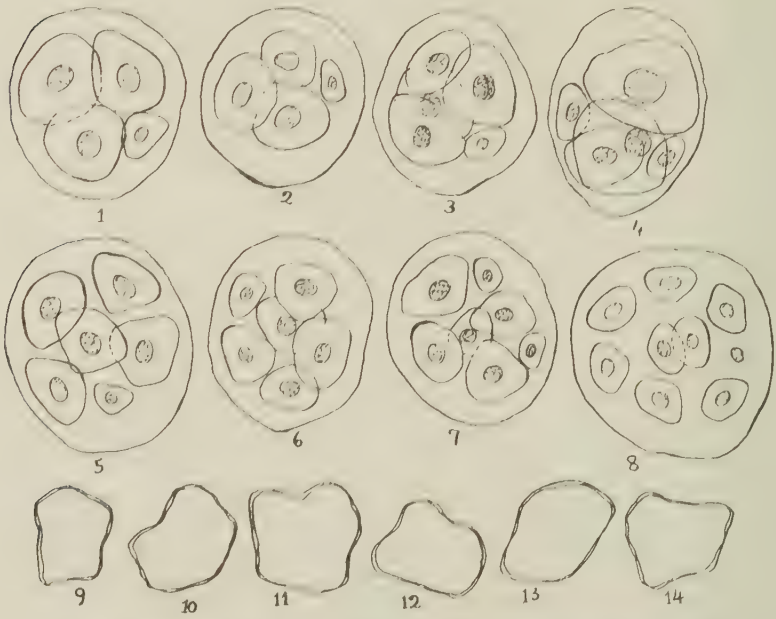
TABLE IV

Name of species	Percentage of ungerminated pollens on the medium		
	1st day after anthesis	2nd day after anthesis	3rd day after anthesis
Actinophloeus Macarthurii	27.7	33	60
Areca triandra	38.5	40	52
Chrysalidocarpus lutescens	42.4	60	71

2. Experiments to find out the germinating capacity of pollens on stigma were conducted by direct transference of pollens over the stigmatic surface. The detailed procedure up to staining has

been outlined under the column « Materials and Methods ». The results have been outlined in the Table II.

3. Considerable variation in pollen sterility was noted in different season. The results have been tabulated in the Table III. Pollens were taken from fresh flower in each experiment.



Figs. 1 to 8 — Formation of tetrads, pentads, hexads, heptad and octad with micronucleus in *Pritchardia pacifica, Rhapis flabelliformis, Livistona chinensis, Oreodoxa regia, Chrysalidocarpus lutescens, Cocos nucifera, C. lutescens* and *Borassus flabellifer* respectively.

Figs. 9 to 14 — Deformed pollen grains in *Rhapis humilis, Chrysalidocarpus lutescens, Actinophloeus Macarthurii Cariota mitis, Dypsis madagascariensis* and *Cocos schizophylla* respectively.

4. It has been observed that from anthesis onwards, gradually the capacity of germination of pollens on the medium decreases. The results have been tabulated in the Table IV.

5. In the Table V the species with few mother cells and those with empty anther sacs have been listed.

TABLE V

Empty anther sacs	Few mother cells
Thrinax barbadensis	*Thrinax barbadensis*
Rhapis flabelliformis	*Rhapis flabelliformis*
Latania Commersonii	*Chrysalidocarpus lutescens*
Chrysalidocarpus lutescens	*Actinophloeus Macarthurii*
Dypsis madagascariensis	*Areca triandra*
Caryota mitis	*Dypsis madagascariensis*

It is interesting to note that sterility of the flowers is found to occur maximum at the tip of the inflorescence. Comparatively less sterile ones are found in the lower portion.

DISCUSSION

A glance at the Table I indicates the presence of irregularities in meiosis in all the species so far studied. In almost all of found the percentage of their ocurrence is quite high. The irregularities include all the chromosome aberrations, specially nondisjunction, lagging etc.. In all the species, at the same time, deformed and empty pollens have been found to occur regularly. The percentage of their occurrence of the latter is, however, less than that of the former. Lastly, in the artificial medium provided for pollen germination, a high frequency of pollen grains did not show any germination. It is noteworthy that the percentage of such ungerminated pollen is much higher than the percentage of occurence of deformed and empty grains.

The percentage of empty pollens is in all cases less than that of the deformed pollens. This possibly indicates that empty grains are not formed unless they have a grossly abnormal or deficient chromosome constitution. Apparently it is most striking that the irregularity-percentage far exceeds the sum total of deformed and empty pollens. This is practically universal in all cases. The sum total of deformed and empty pollens in some cases is merely half of that of irregularities. If one is to assume that the irregularities result in empty or deformed pollens, the data gathered do not tally with the assumption. In other words, one is to infer that

all these irregularities noted in meiosis do not necessarily form deformed or empty pollens. The fact does not preclude the possibility of all the irregularities resulting in nonviable pollens. All of them may not retain their viability without necessarily giving rise to empty or deformed pollens.

An explanation of this behaviour can be obtained if attention is directed towards the types of irregularity recorded. Nondisjunction and lagging as have been pointed out earlier are the important ones of such abnormalities. It is well known that out of nondisjunction gametes can be formed which are either deficient or possess increased chromosome constitution. It is quite unlikely that the latter forms either deformed or empty grains though they may be however nonviable, because of abnormal genomic constitution. This amounts to the fact that such mother cells would result into 50 % of the pollens becoming possibly deformed or sterile. Similar is the case with P. M. C.'s showing lagging chromosomes. In cases where univalents lag, obviously 50 % showing deficiency. The latter may, however, possibly contribute to empty or deformed pollens.

On the basis of this assumption the percentage of empty or deformed pollens as compared to the high percentage of irregularities is quite explainable.

Another interesting feature worth discussion is the incapability of a high percentage of pollen grains to germinate in the artificial medium provided. It has already been pointed out while dealing with « Materials and Methods » that the medium was selected after a series of trials to different prescribed medium for germination of pollen grains. The medium chosen here was found to be the most congenial one providing the growth of maximum number of pollen tubes.

The problem thus posed is therefore — what is the cause of such heavy pollen sterility as far as germination on artificial medium is concerned? It has already been emphasized that the frequency obtained is much higher than the percentage of irregularities or the empty and the deformed pollens. Their frequency is so high as to exceed even the sum total of the irregularities, the empty and the deformed pollens. This is the case in some species such as *Licuala grandis*.

This incapability of germination can, however, be explained if the factors leading to such behaviour are carefully studied.

There is no doubt, as it is an observed fact, that the deformed and the empty pollens do not germinate at all. Obviously the ungerminated pollens include the deformed and the empty ones too. Of the full and apparently normal grains further, some may fail to produce pollen tubes thus indicating nonviability. This is because of the fact that the pollens which arise out of nondisjunction containing increased chromosome constitution may not be able to germinate due to their different genomic constitution and thus an unbalanced set up. Their appearance in all probability, however, may remain quite normal without showing any indication of deformity.

In addition to the empty, deformed as well as such pollens with numerically altered chromosome constitution, in a number of other cases too, the failure of pollen tube production may be noticed. This is the case where gene mutations affecting pollen viability, perceptible or imperceptible, structural chromosomal alterations occur. It has been indicated in the text that the chromosome complements undergo both numerical and structural alterations in their somatic complement. In some cases such as in *Caryota mitis* and *Chrysalidocarpus lutescens,* such events have been noted even in germ cells. It is not unlikely that gene mutations or minute chromosomal alterations as noted in the somatic cells may also occur in the P. M. C.'s too which are quite imperceptible in nature specially in the swollen meiotic chromosomes. These mother cells obviously may form gametes which would be nonviable and thus incapable of producing pollen tubes.

Therefore, it seems that pollens with no contents, deformed shape, numerically or even imperceptible structurally altered chromosome complement or with gene mutation may all contribute to their nonviability. If all these factors are taken into consideration, the observation of a high frequency of ungerminated pollens in the artificial medium is quite explainable.

Experiments involving trials on the germination of the pollen grains on their own stigma were also carried out, the results of which have been tabulated in Table II. It was not possible to carry out such investigation on all the species specially because of several difficulties which need no explanation. It may only be mentioned that the main difficulty involved the difference in time of pollen maturity and stigma receptivity. In majority of the cases, the two do not coincide and as such series of trials are necessary to affect

successful pollination. The height of the plants provided much difficulty in carrying out such continued operations. It is desired, however, that this aspect of study should be thoroughly investigated, and systematic attempts are already being given.

All the three species, viz., *Actinophloeus Macarthurii*, *Areca triandra* and *Chrysalidocarpus lutescens* subjected to such investigation revealed quite interesting results. The experiments were conducted during winter. The reason for choosing this particular season for investigation is due to the fact that during the winter, maximum germination of pollen grains were found (vide Table III). Such seasonal variation between the winter and the rains gives an indication of effect of climatic factor on pollen germination.

It is clear from Table II that the ungerminated grains were obtained in higher percentage on stigma than on artificial medium. No doubt the scarcity of space over the stigmatic surface stands against their germination. In any case, this is the condition which prevails in the species in nature, and as such, this data is of utmost significance. 95 % of the grains in *Chrysalidocarpus lutescens*, 65 % of *Areca triandra* and 70 % of *Actinophloeus Macarthurii* were found to lie ungerminated over the stigmatic surface. Furthermore, it should be emphasised that the records were taken from a number of flowers of each species and the percentage was calculated from the total. Some of the flowers were obtained with practically no germinating pollen tube over their stigma.

There is no doubt that the meiotic irregularities can account partially for this sterility. In addition to this, it appears that gene mutation, the effect of which could not be noticed even in the artificial medium, are also responsible for this failure of germination. Furthermore, biological factors may be there, which need thorough investigation.

Lastly, the data recorded in Table IV need discussion. It was noted that the percentage of pollen tube growth in the artificial medium was found to be different with pollen from flowers plucked after first, second and third day of anthesis. The sterility showed an increase with the increase in the post anthesis period. This, however, is a phenomenon which is often noticed in a number of plants too, and is quite common in nature. It appears that continued exposure to the external environment after the rupture of the anther decreases pollen viability.

In addition to these data, it may further be emphasized that

absolute empty anther sacs without any pollens were obtained in the following species, which have been tabulated in Table V. This is a phenomenon, which indicates high degree of male sterility.

In any case, the data obtained from Table I as well as others indicate clearly that the pollen sterility is quite high in Palms. This is an observation, which lends strong support to the inference presented in the previous paper. This inference is that in case of Palms reproduction through sexual means is not of absolute necessity for the propagation of the individual and the production of fruits. The reproduction of the individuals is mainly dependent on vegetative means through which the plant propagates before reaching maturity. The fruit production may to a large extent depend on apomixis.

SUMMARY

1. The present paper deals with the male sterility in twenty--eight species of Palms. Percentage of deformed pollens and percentage of empty pollens were counted. Pollen grains were dusted on a standard medium for germination and percentage of ungerminated grains were calculated.

2. Experiments involving germination of pollen grains on the stigma were conducted and percentage of ungerminated grains were noted.

3. The percentage of irregularities in meiosis like nondisjunction, lagging, pentads etc. has been correlated with male sterility and the different issues have been discussed.

4. Percentage of pollen sterility in different seasons was taken and tabulated for showing the effect of seasonal variation with pollen sterility.

5. Percentage of nonviable pollens were counted in different days after anthesis of flowers and the result was tabulated.

6. Empty anther sacs and the anthers with a few mother cells or deformed mother cells were found in some cases. After observation of a large number of inflorescences, the tip portion of the inflorescence was found to contain flowers with more sterile pollens than the lower portion of the inflorescence.

7. On the basis of the available data, it has been suggested that sexual reproduction is not of absolute necessity for propagation and fruit production in Palms. Propagation through vegetative

means before the plant reaches maturity is of more significance than sexual reproduction in this family of plants. Fruit production, emphasized in the previous paper too, may depend to a large extent on apomixis.

SUMÁRIO

1. O presente trabalho trata da esterilidade masculina em 28 espécies de palmeiras. Contou-se a percentagem de grãos de pólen deformados e a percentagem de grãos de pólen vazios. Os grãos de pólen foram espalhados num meio-padrão, para germinação, e foi determinada a percentagem de grãos não-germinados.

2. Foram levadas a efeito experiências sobre germinação dos grãos de pólen no estigma e anotou-se a percentagem de grãos não-germinados.

3. Correlacionou-se a percentagem de irregularidades na meiose, tais como não-disjunção, retardamento, pêntadas, etc., com a esterilidade masculina e discutiram-se os diferentes casos.

4. Observou-se a percentagem da esterilidade de pólen em diferentes estações, registando-se os resultados em tabelas para se mostrar o efeito da variação estacional com a esterilidade do pólen.

5. Contou-se a percentagem de grãos de pólen não-viáveis em diferentes dias, após a antese, cujos resultados se apresentam em tabelas.

6. Encontraram-se, nalguns casos, anteras vazias e anteras com poucas células-mães ou células-mães deformadas. Após a observação de grande número de inflorescências viu-se que a extremidade superior da inflorescência contém flores com mais grãos de pólen estéreis do que a parte inferior da inflorescência.

7. Com base nos dados de que se dispõe, foi admitido que a reprodução sexual não é de absoluta necessidade para a propagação e produção de frutos nas palmeiras. A propagação por meios vegetativos, antes que a planta atinja a maturidade, tem maior importância do que a reprodução sexual nesta família. A produção de frutos, posta também em relevo em trabalho anterior, pode depender, em grande parte, da apomixia.

ACKNOWLEDGEMENT

The author wishes to acknowledge his sincere thanks to his teacher, Dr. A. K. SHARMA, D. Sc., Lecturer in Botany, Calcutta

University, under whose constant guidance the work has been carried out.

REFERENCES

BUCHHOLZ, J. T.

1931 The dissection, staining and mounting of styles in the study of Pollen--tube distribution. *Stain Tech.* **6**: 13-24.

SHARMA, A. K. & SARKAR, S. K.

1956 Cytology of different species of Palms and its bearing on the solution of the problems of phylogeny and speciation. *Genetica* (in press).

SWANSON, C. P.

1940 The use of Acenaphthene in pollen tube technic. *Stain Tech.* **15**: 49-52.

WODEHOUSE, R. P.

1935 *Pollen grains*. McGraw Hill Book Co., New York.

SOBRE *OXALIS CERNUA* THUNB.

UM ESTUDO SOBRE O SEU VALOR EM VITAMINA C

POR *DELMIRO MODESTO SIEIRO*
(Estação Agronómica Nacional)

É a *Oxalis cernua* THUNB., uma planta que invade as terras de cultura, mas tem, como se sabe, aproveitamento forrageiro. Por isso, tendo ocorrido a necessidade de conhecer, em seguimento de outros estudos sobre esta planta, os seus diversos aspectos bioquímicos, impôs-se a determinação da sua riqueza vitamínica.

O presente trabalho ocupa-se da vitamina C, cujo teor determinámos realizando paralelamente alguns ensaios comparativos para ajuizar:

a) da capacidade de diversos ácidos para a extracção da vitamina C, sem prejuízo da sua eficiência como estabilizadores desta vitamina;
b) da eficácia relativa dos acetatos neutro e básico de chumbo e do acetato de mercúrio como eliminadores das substâncias interferentes na reacção de titulação do ácido ascórbico com o 2-6-diclorofenolindofenol;
c) da influência que pode ter na destruição do ácido ascórbico a conservação dos materiais pela secagem a temperaturas moderadas, afim de se verificar a possibilidade prática de realizar estudos em avultado número de amostras, colhidas na mesma data.

MATERIAL E MÉTODOS

Para o presente estudo utilizaram-se, além das plantas de *Oxalis cernua* THUNB., as de uma leguminosa, a luzerna (*Medicago sativa* L.) e de uma gramínea, a cevada (*Hordeum vulgare* L.).

A apanha das plantas para este estudo fez-se nos princípios

da primavera, excepto as que serviram para as determinações dos valores dos Quadros III e IV, que se colheram nos fins da primavera, portanto em fase vegetativa mais avançada.

De cada uma delas foram colhidas, em diferentes locais, nos terrenos da Estação Agronómica Nacional, em Sacavém, porções que formaram a amostra geral da respectiva espécie vegetal. Feita a colheita de manhã e dividida cada uma das amostras em duas partes, destinaram-se uma a doseamento da vitamina C, no mesmo dia da colheita, e a outra a idêntico doseamento, após a secagem parcial, a que se procedeu num secador eléctrico a 60°-70° C.

O método de doseamento de vitamina C foi o de Bessey e King, o da titulação pelo 2-6-diclorofenolindofenol do ácido ascórbico em solução ácida. Executou-se o doseamento segundo a técnica descrita por VILLELA (1), preparando-se o material do modo seguinte:

Maceraram-se no «Waring Blendor», durante 5 minutos, 20 gramas de material com 200 ml de solução ácida a 5 %, empregando-se para esta solução o ácido metafosfórico ou qualquer destes três ácidos: acético, oxálico e sulfúrico.

Filtrou-se. E, tomando 1 ml de filtrado, correspondente, portanto, a 0,1 g de material e juntando 10 ml de solução tampão de pH = 3,8, determinou-se nele o teor de vitamina por titulação com 2-6-diclorofenolindofenol.

Efectuaram-se também determinações de recuperação de vitamina C nas suas soluções puras feitas com ácido ascórbico e nos extractos dos três materiais referidos, em que se encorporou uma quantidade conhecida desse ácido ascórbico.

RESULTADOS EXPERIMENTAIS

No Quadro I registámos os teores da vitamina C no material referido, extraída por meio dos quatro ácidos atrás mencionados. Neste mesmo quadro inscreveram-se também os resultados das determinações nos extratos purificados pela adição de acetatos.

Por se admitir a possibilidade de perdas de ácido ascórbico, em consequência do emprego dos acetatos, efectuámos ensaios complementares, utilizando uma solução pura de ácido ascórbico de concentração conhecida. Os resultados destes ensaios mostram que a adição dos acetatos de chumbo, neutro e básico, não provocou nenhuma perda do ácido ascórbico titulável, cuja presença, pelo

contrário, não pôde ser reconhecida na solução tratada com o acetato de mercúrio.

Avaliámos também o grau de estabilidade do ácido ascórbico em cada um dos quatro ácidos extraentes e, portanto, o valor destes como protectores da vitamina C contra a oxidação, efectuando dois doseamentos daquele ácido com intervalo de 24 horas, numa solução de concentração conhecida (Quadro II). Efectuámos ainda uma outra série de determinações com o fim de se ajuizar do método através da recuperação do ácido ascórbico adicionado e para este efeito juntou-se ao material verde em estudo, antes da extacção, uma quantidade conhecida de ácido ascórbico e efectuou-se o doseamento com material enriquecido, em confronto com o material isento desse enriquecimento (Quadro III).

QUADRO I

DOSEAMENTO DA VITAMINA C NA PLANTA VERDE APÓS A COLHEITA

Planta	Humidade %	Ácidos	Em mg por 100 g de material (1)			
			Em extractos não purificados	Em extractos purificados com acetatos: básico de chumbo	neutro de chumbo	de mercúrio
Oxalis	91,2	Metafosfórico	70,0 (795)	70,0 (795)	70,0 (795)	0
		Acético	85,5 (971)	75,7 (860)	73,8 (838)	0
		Oxálico	78,0 (886)	77,4 (879)	77,4 (879)	0
		Sulfúrico	78,5 (892)	75,7 (860)	77,4 (879)	0
Luzerna	81,8	Metafosfórico	189,0 (1038)	189 (1038)	189,0 (1038)	0
		Acético	151,0 (879)	137 (742)	140,0 (769)	0
		Oxálico	196,0 (1076)	178 (977)	176,0 (967)	0
		Sulfúrico	194,0 (1065)	191 (1049)	193,0 (1060)	0
Cevada	74,2	Metafosfórico	73,0 (283)	72,7 (282)	72,7 (282)	0
		Acético	63,0 (244)	61,0 (236)	61,0 (236)	0
		Oxálico	70,7 (274)	68,9 (267)	68,9 (267)	0
		Sulfúrico	65,6 (254)	61,2 (237)	57,4 (222)	0

(1) Os números entre parênteses exprimem os teores em miligramas por 100 gramas de matéria seca.

Por último, no Quadro IV, damos os resultados obtidos no material submetido a secagem parcial e as perdas que ocorreram no material seco.

QUADRO II

ESTABILIDADE DO ÁCIDO ASCÓRBICO NOS VÁRIOS ÁCIDOS

(Solução de ácido ascórbico contendo 1 mg por ml)

Ácido a 5 %	pH da solução	Inicial mg/ml	Após 24 horas mg/ml	Perda %
Metafosfórico	1,2	1,0	0,978	2,2
Acético	1,8	1,0	0,978	2,2
Oxálico	0,8	1,0	0,969	3,1
Sulfúrico	0,4	1,0	0,734	26,6

QUADRO III

ENSAIO DE RECUPERAÇÃO DE ÁCIDO ASCÓRBICO

Planta	Ácidos	Sem adição de ácido ascórbico		Com adição de acido ascórbico (0,0909 mg por cada ml de solução)		
		Diclorofenol gasto	Percentagem mg/100 g	Diclorofenol gasto	Ácido ascórbico doseado em cada ml de sol. final mg	Recuperado %
Oxalis	Metafosfórico	0,44	56	1,12	0,0911	100,26
	Acético	0,44	56	1,10	0,0886	97,47
	Oxálico	0,46	58	1,14	0,0913	100,44
	Sulfúrico	0,46	58	1,10	0,0863	94,94
	Nota: Título de diclorofenol: 1 ml = 0,12658 mg de vit. C					
Luzerna	Metafosfórico	1,32	168	1,90	0,0886	97,47
	Acético	1,16	147	1,76	0,0865	95,16
	Oxálico	1,20	152	1,78	0,0872	95,93
	Sulfúrico	1,20	152	1,78	0,0872	95,93
	Nota: Título de diclorofenol: 1 ml = 0,12733 mg de vit. C					

QUADRO IV

DOSEAMENTO DA VITAMINA C NO MATERIAL VEGETAL, VERDE E SECO, EXTRAÍDA COM O ÁCIDO METAFOSFÓRICO, SEM PURIFICAÇÃO

	Material verde				Material parcialmente seco	
Planta	Humidade %	Matéria seca %	Vit. C na m. s. existente em 100 g de subst. verde mg	Vit. C em 100 g de matéria seca mg	Vit. C em 100 g de matéria seca mg	Perda %
Oxalis	92,99	7,01	46,1	657,6	300	54,3
Cevada	87,02	12,98	41,1	315,8	121,2	61,6
Luzerna	79,64	20,46	111,4	544,4	368,2	32,2

DISCUSSÃO

Sendo a vitamina C uma substância de grande instabilidade, oxidando-se fàcilmente em contacto com o ar e com outros elementos, torna-se necessário protegê-la contra esses factores de destruição, quando se faz a sua extracção e doseamento.

Em solução aquosa, em meio alcalino ou neutro, a instabilidade é máxima. Em meio ácido, obtem-se uma estabilidade mais duradoura, de que resulta o uso generalizado de soluções ácidas na extração e conservação do ácido ascórbico. Contudo, este facto levantou o problema de saber qual o ácido que melhor desempenharia esse papel protector da vitamina C. Esse estudo tem sido, aliás, realizado por numerosos experimentadores e vários ácidos têm sido aconselhados com aquele objectivo.

Dentre esses trabalhos destaca-se o de PONTING (7) que experimentou treze ácidos, tendo chegado à conclusão de que o metafosfórico e o oxálico são os que melhor satisfazem.

Todavia, os ácidos acético e tricloroacético aparecem citados com frequência, embora este último tenha sido posto definitivamente de parte por se reconhecer que oxida a vitamina e reduz o diclorofenolindofenol (1).

PONTING verificou que o ácido acético também não é dos melhores, pois numa solução de ácido ascórbico naquele ácido a

perda subiu a 31,4 %, decorridas 24 horas. Nessa mesma solução, quando continha cobre, revelou-se no mesmo espaço de tempo 99,5 % de destruição. Nas mesmas condições, com ácido metafosfórico, essas perdas foram respectivamente, de 2,8 % e 14,4 %.

Nos nossos ensaios (Quadro II) os resultados obtidos são semelhantes aos de PONTING, no que diz respeito aos ácidos metafosfórico e oxálico, em que se verificou, ao fim de 24 horas, uma perda, respectivamente, de 2,2 % e 3,1 %. Mas no ácido acético o resultado não foi desanimador, pois que a perda não ultrapassou 2,2 %. Como a perda é igual à observada com o metafosfórico, sob este aspecto, o ácido acético pode enfileirar ao lado dos outros dois considerados os melhores. Acresce que, em material que se saiba conter grandes quantidades de Fe^{++}, se recomenda o ácido acético, por inibir a acção deste catião (2). Em material muito rico em proteínas o ácido mais eficiente, dentre estes ácidos, é o metafosfórico, que tem ainda a seu favor o retardar a oxidação do ácido ascórbico, inactivando o efeito catalítico da ascorbinase e do cobre.

Com o ácido sulfúrico o resultado que obtivemos não é de molde a considerá-lo aconselhável, visto que a perda verificada foi de 26,6 % ao fim de 24 horas, revelando-se, assim, ser dos quatro ácidos ensaiados o que menor estabilidade assegurou ao ácido ascórbico.

O objectivo destes ensaios, como atrás ficou dito, foi verificar até que ponto poderia confiar-se aos outros ácidos o papel protector da vitamina C, quando o ácido metafosfórico, reagente caro, seja, por qualquer motivo, de difícil aquisição. Parece-nos que, na análise rotineira, dos quatro ácidos que empregámos, apenas o ácido sulfúrico não satisfaz podendo por conseguinte considerarem-se todos os outros equivalentes, quanto à sua acção, a não ser em casos especiais, como, por exemplo, no caso do cobre e do ferro, em que por vezes há necessidade de preferir o emprego de um ou outro.

O Quadro I mostra-nos que os resultados do doseamento da vitamina C, extraída pelos diferentes ácidos, variam com a natureza do material vegetal. Assim, na *Oxalis cernua*, ao ácido metafosfórico correspondeu a percentagem mínima (70 mg), enquanto com o mesmo ácido se obteve na luzerna, um valor muito aproximado (189 mg) do valor máximo que, por seu turno, correspondeu ao ácido oxálico (196 mg).

Idênticas variações se verificam com os outros ácidos. Os que numa planta deram uma percentagem máxima, na outra ou outras deram-na mínima. No entanto, é o ácido metafosfórico que tende a mostrar-se mais produtivo.

A explicação para estas discordâncias não se nos afigura fácil, considerando que todos os ácidos satisfazem, até mesmo o sulfúrico, desde que se faça ràpidamente o doseamento, como, aliás, os números obtidos com ele nas três plantas fazem acreditar.

Descontando a parte relativa ao erro experimental, as diferenças parecem poder atribuir-se à composição química de cada uma das plantas com reação diferente em presença de cada ácido.

As substâncias interferentes na reacção com o diclorofenolindofenol, tais como o glutatião, taninos e certos compostos fenólicos, que reduzem o reagente, podem dar lugar a erros no doseamento do ácido ascórbico. Devem, pois, ser eliminados dos extractos e neste sentido algumas técnicas são preconizadas.

Na técnica de EMMERIE & VAN EEKLEN (5), procede-se a essa eliminação empregando o acetato de mercúrio, fazendo-se idêntico tratamento, quando se pretende a descoloração dos extratos que pela sua tonalidade vermelha, se tornam de muito difícil titulação pelo diclorofenolindofenol, cuja viragem se faz para o rosa.

Acontece, todavia, que o acetato de mercúrio oxida o ácido ascórbico que passa à forma de dehidroascórbico, não sendo este titulável pelo diclorofenolindofenol.

Para o conseguir torna-se necessário tratar o extrato pelo ácido sulfídrico, que reduz o ácido dehidroascórbico à sua forma inicial e arrasta o excesso de mercúrio.

Há objecções contra o emprego de acetato de mercúrio, formuladas por alguns investigadores (4). Assim, estes verificaram, em soluções puras de ácido arcórbico e em sucos de plantas adicionadas de quantidades conhecidas daquele ácido, que, após o tratamento com acetato de mercúrio, não se recuperava mais do que uns 70 % de ácido arcórbico.

Segundo aqueles investigadores, é provável que isto se deva à formação de um composto oxidado, irreversivel, de ácido ascórbico.

Nos nossos ensaios o emprego do acetato de mercúrio, quer no material, quer numa solução pura de ácido ascórbico, revela-nos uma oxidação total, pois a recuperação foi nula; mas, como não fizemos o tratamento pelo SH_2, não temos elementos para avaliar se há ou não reversibilidade. Porém, sabemos que a recuperação

se faz em percentagem bastante elevada, desde que o tempo de contacto entre o ácido ascórbico e acetato de mercúrio não exceda 20 minutos.

Com o mesmo objectivo de eliminação recorremos, também, aos acetatos neutro e básico de chumbo, cujo emprego não provocou perdas de ácido ascórbico, pois a recuperação foi integral.

No Quadro I registámos as percentagens de vitamina C, doseadas no material após o tratamento com os acetatos. Verifica-se uma certa diferença entre os números encontrados nos extratos não tratados e os obtidos depois de terem sido submetidos à acção das referidas substâncias, à excepção daqueles em que se empregou o ácido metafosfórico e em que os valores foram iguais para qualquer das plantas.

Conjugando os valores do Quadro I com o que se observou com respeito ao emprego do acetato de mercúrio, parece, pois, poder concluir-se que bastou a extracção com ácido metafosfórico para se dar a eliminação das substâncias interferentes, ao contrário do que se observa com os outros ácidos.

Quanto à recuperação do ácido ascórbico encorporado nos ensaios com *Oxalis* e luzerna, verifica-se que os resultados são satisfatórios, não revelando diferenças importantes, sobretudo quando o extraente é o ácido metafosfórico.

Como se sabe uma das causas de destruição do ácido ascórbico é a acção da temperatura. Nos alimentos, uma cocção rápida não produz forçosamente uma diminuição notável de vitamina C, mas um aquecimento prolongado pode resultar em perdas importantes ou até mesmo totais (6) e o mesmo se verifica nas forragens secas artificialmente durante certo número de horas, embora a temperaturas relativamente moderadas.

Por motivos atrás expressos, submetemos fracções das plantas com que trabalhamos a uma temperatura de 60°-70° e procedemos ao doseamennto da vitamina C. Obtivemos valores que, comparados aos inicialmente determinados na planta verde e recém-colhida, se mostram muito inferiores.

Na luzerna a percentagem de perda é menos elevada, porque a exposição ao calor, com o fim de baixar o teor de humidade a um certo nível, foi mais reduzida e, assim, o tempo de secagem foi de 3 horas e meia, sendo nas outras duas, aproximadamente, de 7 horas.

No Quadro IV podem ver-se as diferenças no teor em vitamina C nas duas condições, verde e seca. Reconhece-se imediatamente que ocorreu destruição desta vitamina e que as perdas na *Oxalis* e cevada sobem a 54,3 % e 61,1 %, respectivamente. Na luzerna regista-se apenas 32,2 % de destruição, para um tempo de secagem sensìvelmente igual a metade do que se usou para as duas primeiras.

Estes resultados não são mais do que a confirmação dos de outros autores, que provam a acção nefasta do calor sobre o ácido ascórbico.

Nestas condições tem que por-se de parte a hipótese da conservação das forragens por este meio, para doseamentos ulteriores do seu teor em vitamina C.

SUMÁRIO

a) Na extracção da vitamina C da *Oxalis cernua*, da cevada e da luzerna, empregaram-se alguns ácidos. Efectuaram-se ensaios de recuperação de ácido ascórbico puro, para se avaliar o grau de estabilidade concedido por esses ácidos. Chegou-se à conclusão de que os que melhor provaram foram o metafosfórico, o oxálico e o acético.

b) Na eliminação de substâncias interferentes trataram-se os filtrados com os acetados neutro e básico de chumbo e com o acetato de mercúrio. Os dois primeiros não provocaram perdas de vitamina por oxidação. Com o último, torna-se necessária a redução pelo SH_2, uma vez que, pela sua acção, o ácido ascórbico é oxidado e passa ao estado de dehidroascórbico. A acção dos acetatos revelou um certo grau de eliminação de substâncias interferentes, excepto nos casos em que se empregou como extraente o ácido metafosfórico.

c) Os doseamentos da vitamina C no material seco à temperatura de 60°-70° C revelaram uma redução importante em relação ao teor da planta verde e recém-colhida.

d) Por último, e como conclusão final, consideramos que a *Oxalis cernua* contém quantidades apreciáveis de vitamina C, não sendo inferior, neste aspecto, às forragens consideradas naturais.

RÉSUMÉ

a) Pour l'extraction de la vitamine C de l'*Oxalis cernua*, de l'orge et de la luzerne, on a essayé plusieurs acides. Afin d'évaluer le degré de stabilité donnée par ces acides, on a aussi effectué quelques essais de récupération de l'acide ascorbique pur. D'après cette évaluation on a pu conclure que les meilleurs sont l'acide métaphosphorique, l'oxalique et l'acétique.

b) Afin d'éliminer les substances interférentes on a soumis les filtrats à des traitements avec les acétates neutre et basique de plomb et l'acétate de mercure. En ce qui concerne les acétates de plomb, ni le neutre ni le basique, n'ont pas provoqué aucunes pertes em vitamine C par oxidation, mais avec l'acétate de mercure il est nécessaire de réduire le filtrat par le SH_2, puisque l'acétate de mercure exerce son action sur la vitamine C, qu'il oxide donnant lieu à l'acide déhidroascorbique. L'action des acétates neutre et basique de plomb a révélé un certain degré d'élimination des substances interférentes, à l'exception des cas où l'on a employé, pour l'extraction, l'acide métaphosphórique.

c) Par suite des dosages de la vitamine C on a observé que le matériel sec à 60°-70° C a subi une réduction importante par rapport à la teneur que ce matériel possédait lors d'être cueilli.

d) Finalement, on peut conclure que l'*Oxalis cernua* contient de grandes quantités de vitamine C, ce qui nous mène à le considérer comme une plante n'étant pas, à ce point de vue, inférieure à d'autres fourrages considérés.

BIBLIOGRAFIA

1. VILLELA, G. G.
   1948 *Vitaminas. Métodos de dosificacion.* El Ateneo, Buenos Ayres.
2. THE ASSOCIATION OF VITAMIN CHEMISTS, INC.
   1947 *Methods of Vitamin Assay.* Interscience Publishers, Inc., New York.
3. HARRIS, LESLIE, J. & OLLIVER, MAMIE
   1942 The reliability of the method of estimating vitamin by titration against 2:6 — diclorophenolindophenol. 1 — Control tests with plant tissues. *Biochem. J.* **36**: 155-182.

4. MC HENRY, EARLE W. & GRAHAM, MURRAY
1935 Observation of estimation of ascorbic acid by titration. *Biochem. J.* **29** (2): 2013-2019.

5. EMMERIE, A. & VAN EEKLEN, MARIE
1934 The chemical determination of vitamin C with removal of interfering reducing and coloured substances. *Biochem. J.* **28** (2): 1153-1154.

6. STEPP, W.
1942 *Fisiologia, patologia, terapeutica y politica sanitaria de la alimentacion. Las vitaminas*. Editorial Labor, S. A., Barcelona.

7. PONTING, J. D.
1943 Extraction of ascorbic acid from plant materials. Relative suitability of various acids. *Ind. Eng. Chem. (Anal. Ed.)* **15**: 389.

PROTEÍNAS DO TRIGO

AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS DE ALGUNS TRIGOS CULTIVADOS EM PORTUGAL (1)

POR *A. PEREIRA* (2)
(Estação Agronómica Nacional)

INTRODUÇÃO

O desenvolvimento e aperfeiçoamento dos métodos cromatográficos e microbiológicos para a determinação dos aminoácidos tornou possível o conhecimento da composição e do valor das diferentes proteínas e produtos alimentares quanto aos seus aminoácidos constituintes.

É obvio que o valor biológico de uma proteína depende da natureza, quantidade e proporção em que os aminoácidos essenciais ocorrem na sua molécula, e que, para cada proteína ou mistura de proteínas, a limitação química do seu valor biológico é determinada pelo aminoácido que se encontrar em deficiência. Quando esta deficiência é remediada pela adição desse aminoácido, uma nova deficiência em algum outro aminoácido pode constituir um segundo factor limitante do seu aproveitamento e assim sucessivamente.

Ùltimamente, têm-se estabelecido relações entre as deficiências em determinados aminoácidos essenciais e os baixos valores biológicos de certas proteínas ou de produtos alimentares. Assim, em várias experiências de alimentação, observaram-se deficiências de lisina na gliadina e no milho (1).

De acordo com o teor e a proporção em que se encontram os aminoácidos essenciais nas diferentes proteínas, estas podem classificar-se em: *proteínas de alta qualidade* — as que contêm os aminoácidos essenciais em proporção aproximada à requerida e aproveitada pelo organismo — e *proteínas de baixa qualidade* — aquelas em que os aminoácidos essenciais se afastam dessa

(1) Este trabalho foi realizado no Department of Biochemistry of the University of Wisconsin.

(2) Bolseiro do Instituto de Alta Cultura.

proporção óptima. Como exemplos de proteínas de alta qualidade podem indicar-se as dos ovos, do leite e da carne e como exemplos de proteínas de baixa qualidade as do milho, do arroz e do trigo.

Quando duas proteínas ou dois produtos alimentares são deficientes em aminoácidos diferentes, o valor biológico da sua mistura será maior do que a média dos valores biológicos de cada um, visto que as fracções que, em separado, seriam desaminadas e desaproveitadas por não conterem o aminoácido limitante da sua utilização podem, em conjunto, e desde que o aminoácido limitante não seja o mesmo, completar-se, permitindo, então, que uma parte dessas fracções desaproveitadas venha a conter todos os aminoácidos essenciais e, assim, possa ainda ser utilizada pelo organismo. Desta possibilidade resulta ser aconselhável consumir, conjuntamente, as proteínas, ou produtos alimentares, cujas percentagens em aminoácidos essenciais desempenham entre si uma acção complementar. Encontram-se neste caso as proteínas do trigo e as do leite.

Dentre as substâncias alimentares utilizadas como fonte de proteína, o trigo ocupa, desde os tempos mais remotos, um lugar destacado na alimentação humana, o qual se deve, sem dúvida, à harmonia da sua composição química e à sua riqueza em proteína.

As proporções em que as diversas classes de proteínas entram no grão de trigo são diferentes e variáveis segundo a região, variedade e percentagem de proteína total. A gliadina e a glutenina são, no entanto, as que existem em maiores percentagens, representando cerca de 70 a 90 % da proteína total (2 e 3). É ao conjunto destas duas proteínas e à sua proporção que a farinha de trigo deve as suas peculiares qualidades de panificação, derivadas da formação de glúten.

No caso especial das proteínas do trigo, que são as que neste momento nos interessam, sabe-se que o aminoácido limitante do seu aproveitamento e do seu valor nutritivo é a lisina, que apenas existe na proteína na proporção de cerca de 2,5 (calculada na base do triptofano 1,0), quando a proporção óptima, requerida pelo organismo, é de 5 (4). Como consequência disto, sòmente cerca de metade da proteína do trigo será aproveitada pelo organismo, o que reduz a 50 %, aproximadamente, o seu valor biológico.

Dada a grande contribuição do trigo para a nossa alimentação, e não tendo conhecimento de quaisquer publicações sobre a

composição em aminoácidos dos trigos cultivados em Portugal, pareceu-nos que um estudo desta natureza seria de interesse, tanto para o melhoramento do trigo, como para um melhor conhecimento do valor nutritivo do respectivo pão. Foi com este objectivo que resolvemos proceder à determinação dos aminoácidos essenciais em alguns trigos cultivados em Portugal.

MATERIAL E MÉTODOS

Os trigos analisados neste trabalho pertencem às duas seguintes espécies: *Triticum aestivum* L. («Quaderna», «Roma», «Precoce» e «Pirana») e *Triticum turgidum* L. («Argelino» e «Bagudo»). Estes trigos foram provenientes da Estação de Melhoramento de Plantas, de Elvas, da colheita de 1954.

De cada um destes trigos, moemos cerca de 100 g, de forma a que toda a farinha passasse por um crivo com orifícios de 1 mm de diâmetro. Em cada uma destas farinhas totais procedemos às seguintes determinações:

1) *Humidade*

Tomámos 1-1,5 g de farinha e secámo-la a 105° C, durante 24 horas.

2) *Azoto total*

Usámos o método macro-Kjeldahl. O destilado foi recebido em 50 ml de uma solução saturada de ácido bórico contendo um indicador (bromocresol verde) e a titulação foi feita com ácido clorídrico 0,1 *N*.

3) *Proteína total*

Calculou-se, multiplicando os valores de azoto total pelo factor 5,7.

4) *Hidrólise da proteína*

Foi feita directamente na farinha, de acordo com os estudos realizados no Departamento de Bioquímica da Universidade de Wisconsin (5 e 6) nos quais se estabeleceram as condições óptimas de hidrólise para se obter a máxima libertação dos aminoácidos. A preparação dos hidrolisados para a determinação dos vários aminoácidos, com excepção da triptofana, foi feita da seguinte

forma: 3 *g* de cada amostra de farinha eram hidrolisados em autoclave a 250° F, (121° C) com 750 ml de ácido clorídrico 2,5 *N* durante 8 horas. O volume dos hidrolisados foi, a seguir, reduzido para cerca de 25 ml, por meio de vácuo, mantendo a temperatura a cerca de 50° C e a pressão abaixo de 55 mm de mercúrio. Cada hidrolisado foi, então, diluído com sucessivas lavagens para cerca de 300 ml, ajustado a pH 4 com hidróxido de potássio 5 *N* para precipitar a maior parte da humina, e filtrado, lavando o precipitado com água a pH 4. Os filtrados foram, então, ajustados a um pH de 6,5 a 6,8 e à mesma concentração de sal (cloreto de potássio) pela adição de uma quantidade de cloreto de potássio 4 *N*, prèviamente calculada em função do hidróxido de potássio 5 *N* gasto.

É necessário que a concentração final de sal no hidrolisado seja inferior a 0,7 *N*, para evitar alguma inibição dos organismos usadas na determinação dos aminoácidos. Cada um destes filtrados foi, por fim, diluído para um volume de 500 ml e guardado no frigorífico, juntando-lhe prèviamente algumas gotas de toluene.

Para a determinação da triptofana, a hidrólise da proteína foi feita em meio alcalino e os hidrolisados foram preparados da seguinte forma: 1,5 *g* de cada farinha foram hidrolisados em autoclave a 121° C com 50 ml de hidróxido de potássio 5 *N* durante 12 horas. Cada hidrolisado foi, então, diluído para cerca de 300 ml, ajustado a pH 6,5-6,8 com ácido clorídrico 2,5 *N* e filtrado. Depois de ajustados à mesma concentração de sal, com cloreto de potássio 4 *N*, foram diluídos para um volume de 1000 ml e guardados no frigorífico.

Convém ter presente que esta hidrólise alcalina ocasiona a racemização da triptofana e que o microorganismo utiliza apenas a forma L-triptofana, pelo que os valores obtidos terão de ser multiplicados por 2.

5) *Determinação dos aminoácidos*

Nos hidrolisados assim preparados, procedemos à determinação dos aminoácidos essenciais por meio de ensaios microbiológicos, segundo as técnicas em curso no Departamento de Bioquímica da Universidade de Wisconsin.

Os métodos microbiológicos para a determinação dos aminoácidos baseiam-se no princípio de que o crescimento e a actividade de determinados organismos, que não podem desenvolver-se normalmente na ausência de um determinado aminoácido, está direc-

tamente relacionado com a quantidade desse aminoácido presente no meio de cultura.

No caso das bactérias, o ácido láctico produzido por estes microorganismos no decurso das suas actividades metabólicas é directamente proporcional, dentro de certos limites, à quantidade desse aminoácido existente no meio, e a sua titulação directa com hidróxido de sódio é suficiente para se estabelecer uma curva-padrão.

Os microorganismos usados na determinação dos diferentes aminoácidos foram os seguintes:

Leuconostoc mesenteroides P-60, para a lisina, fenilalanina, leucina, metionina e histidina.

Lactobacillus arabinosos 17-5, para a isoleucina e valina.

Streptococcus faecalis R, para a trionina, arginina e triptofana.

O meio basal usado nestes ensaios — o de HENDERSON & SNELL (7), com algumas modificações, foi preparado a partir das duas seguintes soluções:

Solução A — (Mistura de aminoácidos)

DL - alamina	200 mg	DL - isoleucina	40 mg
DL - ácido aspártico	200 »	DL - metionina	40 »
L - ácido glutâmico	200 »	DL - fenilalanina	40 »
L - arginina HCl	40 »	DL - serina	40 »
L - lisina HCl	40 »	DL - treonina	40 »
L - cistina	20 »	DL - triptofana	40 »
L - histidina	20 »	DL - valina	40 »
L - leucina	20 »	glicina	20 »
L - prolina	20 »	Total	1 080 mg
L - tirosina	20 »		

Esta mistura é dissolvida em água quente e diluída para um volume de 50 ml. Para cada aminoácido a ensaiar é feita uma solução, omitindo-se na respectiva mistura o aminoácido em questão.

Solução B — (Solução de vitaminas, sais e tampão)

Glucose	4,0	g	
Citrato de potássio	4,41	»	
Acetato de sódio	0,2	»	
Cloreto de amónio	0,6	»	
Fosfato de potássio	1,0	»	
Solução de sais	4,0	ml	(ver adeante)
Solução A. G. U. X.	2,0	»	(ver adeante)
Solução de vitaminas	2,0	»	(ver adeante)
Solução Tween 80 a 1 %	1,0	»	

Esta mistura é dissolvida em água e diluída para um volume também de 50 ml.

Solução de sais

$MgSO_4.7H_2O$	10,0 g
$FeSO_4.7H_2O$	0,5 »
$MnSO_4.7H_2O$	2,0 »
HCl conc.	0,5 ml

Dissolve-se em água quente e dilui-se para 250 ml.

Solução A. G. U. X.

Sulfato de adenina	250 mg
Guanina HCl	250 »
Uracil	250 »
Xantina	250 »

Dissolve-se com um mínimo de hidróxido de potássio e dilui-se com água para 250 ml.

Solução de vitaminas

Niacina	25 mg
Tiamina HCl	25 »
Pyridoxal	5 »
Pantotenato de Ca	25 »
PABA	5 »
Solução de ácido fólico	1 ml
Solução de biotina	1 »
Riboflavina	25 mg

Pesa-se a riboflavina, separadamente, e dissolve-se em água quente. As restantes vitaminas dissolvem-se em água à temperatura ambiente e misturam-se com a solução de riboflavina, depois de arrefecida. A seguir dilui-se para 250 ml.

A solução de ácido fólico prepara-se dissolvendo 25 mg em 5 ml de hidróxido de potássio 0,1 *N*. Ajusta-se a pH 7 e dilui-se com água para 100 ml.

Para preparar a solução de biotina dissolvem-se 25 mg em água e dilui-se para 100 ml.

Para a preparação do meio basal, misturam-se iguais volumes da solução *A* e *B* e ajustam-se a pH 6,8-7,0.

A cada tubo de ensaio adicionamos 1 ml deste meio.

Soluções-padrão dos aminoácidos

De cada um dos aminoácidos analisados preparámos uma solução-padrão a partir da qual se obtiveram as curvas-padrão de titulação (Fig. 1-10). Os amino-ácidos usados para estas soluções eram da mais alta pureza e, antes de pesados, foram secos durante vários dias num exsicador com ácido fosfórico. Estas soluções foram preparadas em concentrações 10 vezes maiores do que a empregada nos ensaios. Quando se fazia a diluição, juntava-se-lhe uma quantidade calculada de cloreto de potássio 4 *N*, de forma a que a solução-padrão final contivesse a mesma concentração deste sal que os hidrolisados.

Eis, em linhas gerais, a marcha operatória seguida para a determinação dos aminoácidos.

Usámos caixas de cobre que continham 60 tudos de ensaio, dispostos em 10 fileiras, com 6 tubos em cada fileira. Adicionava-se a solução-padrão aos tubos da 1.ª, 5.ª, 6.ª e 10.ª fileiras. Juntavam-se soluções de 3 hidrolisados, em duplicado, aos tubos da 2.ª e 7.ª; 3.ª e 8.ª; 4.ª e 9.ª fileiras.

Nos tubos de cada fileira adicionavam-se diferentes quantidades da solução-padrão do aminoácido e da solução do hidrolisado, de acordo com o seguinte esquema:

Fileiras com solução-padrão (1.ª, 5.ª, 6.ª e 10.ª)

Sol.-padrão	0,0	0,2	0,4	0,6	0,8	1,0 ml
Água	1,0	0,8	0,6	0,4	0,2	0,0 ml

Fileiras com hidrolisados

Hidrolisado	0,2	0,4	0,5	0,6	0,8	1,0 ml
Água	0,8	0,6	0,5	0,4	0,2	0,0 ml

À água usada juntou-se, prèviamente, uma quantidade calculada de cloreto de potássio 4 *N*, de forma a ficar com a mesma concentração de sal dos hidrolisados. Procedendo desta forma, a concentração de sal fica igual em todos os tubos.

A cada tubo adiciona-se, por fim, 1 ml do meio basal atrás referido. O volume final em cada tubo era de 2 ml.

Todas estas quantidades foram adicionadas automàticamente com um Cannon Dispensor.

As caixas com os tubos assim preparados eram, então,

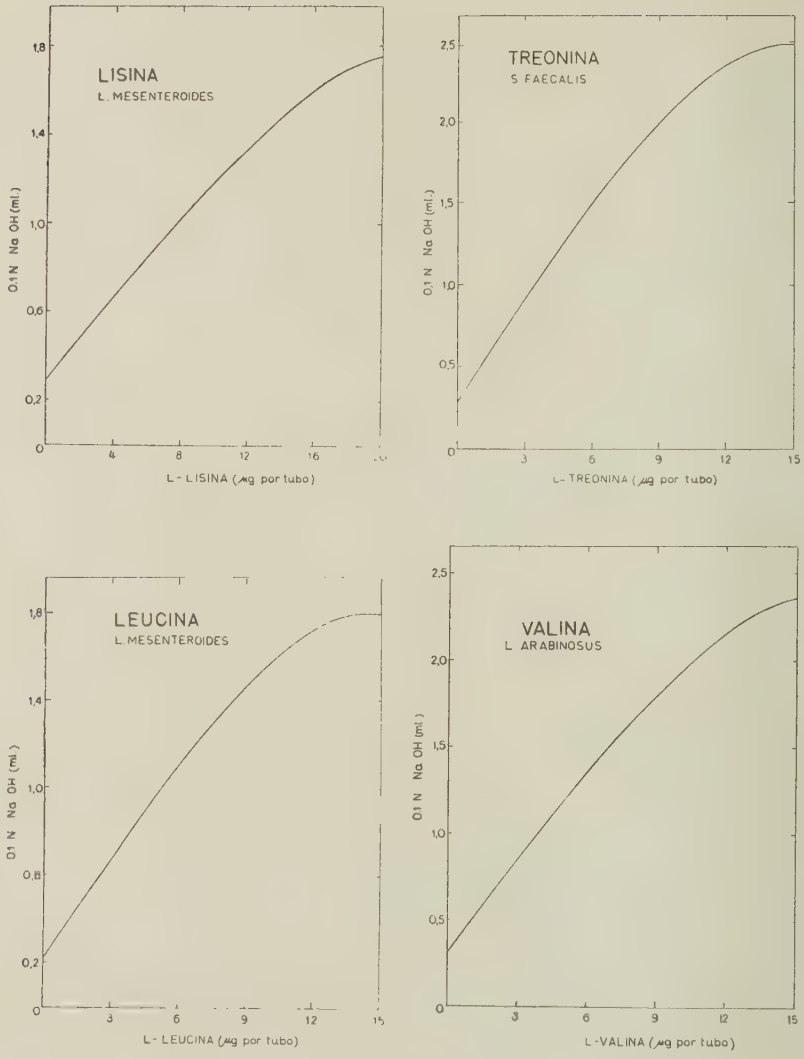


Fig. 1-4 — Curvas-padrão da lisina, treonina, leucina e valina.

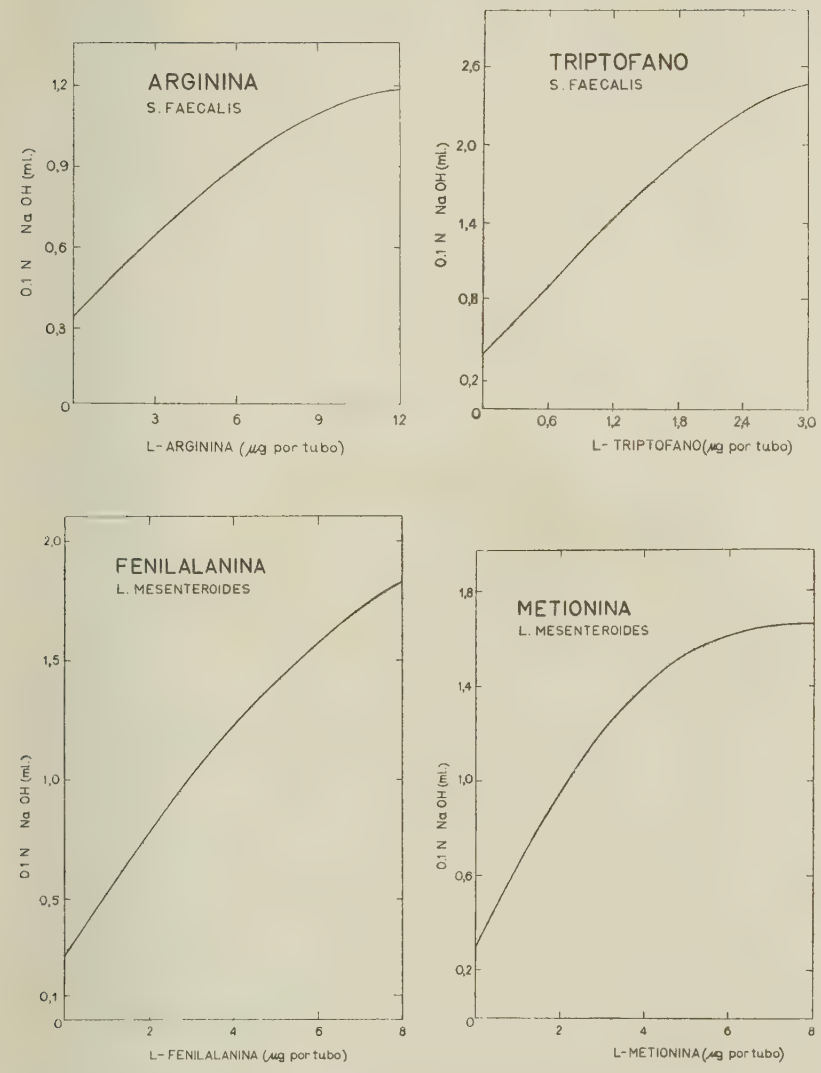


Fig. 5-8 — Curvas-padrão da arginina, triptofano, fenilalanina e metionina.

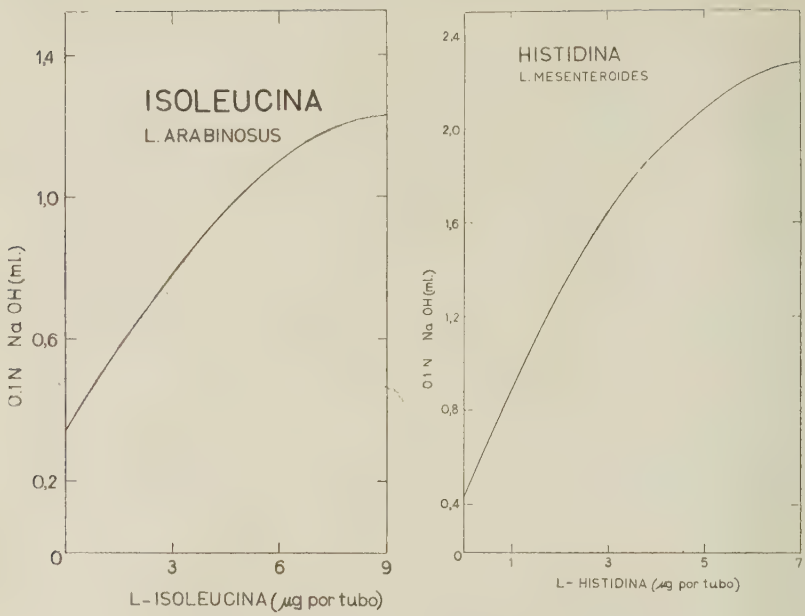


Fig. 9 e 10 — Curvas-padrão da isoleucina e da histidina.

cobertas com uma tampa de cobre que continha uma camada de algodão e, a seguir, esterilizadas em autoclave a 240° F, durante 4-6 minutos. Depois de arrefecidas, inoculavam-se todos os tubos com uma gota, adicionada com uma seringa esterilizada, da suspensão de células do microorganismo apropriado.

A obtenção desta suspensão foi feita da seguinte forma: das culturas «stocks» dos microorganismos inoculavam-se tubos de ensaio com 5 ml de um meio basal completo, os quais eram incubados durante 20-24 horas, a 37° C. Passado este tempo centrifugaram-se estes tubos, durante 10 minutos, deitando-se fora o líquido sobrenadante e suspendendo as células do microorganismo em cerca de 15 ml de uma solução esterilizada de cloreto de potássio a 0,9 %.

As caixas depois de bem agitadas eram postas a incubar durante 68-72 horas, a 35-37° C.

Decorrido este tempo, procedemos à titulação do acido láctico existente em cada tubo. A titulação foi feita com hidróxido de sódio 0,1 *N*, servindo-nos de um titulador Cannon e dum poten-

TABELA I

Aminoácidos essenciais de trigos cultivados em Portugal

(Percentagem na matéria seca)

Trigos	N	Proteína (N × 5,7)	Aminoácidos																	
			Lisina		Treonina		Valina		Fenilalanina		Leucina		Isoleucina		Metionina		Triptofana		Histidina		Arginina	
			No grão	Na proteína (1)	No grão	Na proteína (1)	No grão	Na proteína (1)	No grão	Na proteína (1)	No grão	Na proteína (1)	No grão	Na proteína (1)	No grão	Na proteína (1)	No grão	Na proteína (1)	No grão	Na proteína (1)	No grão	Na proteína (1)
«Bagudo» .	2,77	15,79	0,41	2,37	0,42	2,42	0,82	4,74	0,75	4,33	1,10	6,35	—	—	—	—	0,20	1,15	0,33	1,91	—	—
«Argelino» .	2,41	13,74	0,40	2,66	0,40	2,66	0,69	4,58	0,66	4,38	1,03	6,84	0,77	5,11	0,24	1,59	0,18	1,19	0,30	1 99	0.70	4,65
«Precoce» .	2,26	12,88	0,38	2,69	0,38	2,69	0,61	4,32	0,61	4,32	0,90	6,37	0,70	4,96	0,24	1,70	0,17	1,20	0,26	1,84	—	—
«Roma» . .	2,02	11,51	0,34	2,69	0,35	2,77	0,58	4,59	0,53	4,20	0,83	6,57	0,65	5,15	—	—	—	—	0,24	1,90	0,60	4,78
«Quaderna»	1,89	10,77	0,34	2,88	0,35	2,96	0,55	4,66	0,48	4,06	0,77	6,52	0,60	5,08	—	—	—	—	0,23	1,95	—	—
«Pirana» .	1,75	9,98	0,32	2,92	0,34	3,11	0,51	4,66	0.43	3,93	0,70	6,40	0,53	4,85	—	—	—	—	0,20	1,83	—	—
Média . .	2,18	12,44	0,36	2,70	0,37	2,77	0,63	4,59	0,58	4,20	0,89	6,51	0,65	5,03	0,24	1,64	0,18	1,18	0,26	1,90	0,65	4,72
Variação .	1,02	5,81	0,09	0,55	0,08	0,69	0,31	0,42	0,32	0,45	0,40	0,49	0,24	0,30	0,00	0,11	0,03	0,05	0,13	0,16	0,10	0,13
» %	46,79	46,71	25,00	20,37	21,62	24,91	49,21	9,15	55,17	10,71	44,94	7,53	36,92	5,96	0,00	6,71	16,67	4,24	50.00	8,42	15,38	2,75

(1) Valores calculados para 16 % de N.

ciómetro. Antes da titulação juntávamos a cada tubo 2 gotas de uma suspensão de quinidrona.

Construida a curva-padrão de cada aminoácido (Fig. 1-10), calculávamos por meio dela os microgramas de aminoácido existentes em cada tubo. Estes valores eram, a seguir, referidos a 1 ml do hidrolisado, eliminando-se os resultados que se desviavam da média mais de 10 %. A média dos resultados aproveitados era tomada como valor de ensaio e, a partir dela, calculávamos a percentagem dos aminoácidos nos trigos.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela I apresentam-se os valores obtidos para os aminoácidos essenciais nos diferentes trigos estudados e na Tabela II faz-se a comparação da média de cada aminoácido com alguns valores encontrados na bibliografia. Verifica-se que os valores por nós encontrados concordam, em geral, com os apresentados por esses investigadores.

Examinando os valores encontrados nos trigos analisados, verifica-se que a percentagem dos seus aminoácidos no grão varia directamente com a percentagem de proteína. Quanto mais proteína o trigo contém, maior é a sua percentagem em aminoácidos essenciais.

Quando a percentagem dos aminoácidos é referida em relação à proteína, em vez de o ser relativamente ao grão, as suas variações são muito menos acentuadas. Para a maioria dos aminoácidos determinados a sua percentagem na proteína mostra-se mais ou menos constante. Quanto à lisina e treonina, notam-se, porém, algumas variações. Assim, verifica-se que as percentagens destes aminoácidos na proteína variam inversamente com a percentagem da proteína existente no trigo.

A explicação para a variação destes aminoácidos em relação à proteína total, julgamos residir no facto de que, quando aumenta a proteína total do trigo, aumentam também, em relacção à proteína total, as proporções das proteínas que constituem o glúten, principalmente a da gliadina (2 e 3). Como consequência deste aumento da proporção das proteínas que constituem o glúten, resultará uma diminuição, em relação à proteína total, dos aminoácidos que existam no glúten em percentagem inferior à que existe nas outras proteínas do trigo (albumina e globulina). É o que se passa

TABELA II

Comparação entre os valores encontrados e alguns dos citados na bibliografia (1)

Aminoácidos	Média dos valores encontrados na proteína	Valores citados na bibliografia	
		Métodos microbiológicos	BLOCK & BOLLING (8)
	%	%	%
Lisina	2,70	2,78 (2) (6)	
		2,97 (9)	2,7
		2,46 (10)	
		2,50 (11)	
Fenilalanina	4,20	4,50 (2) (6)	5,7
		4,31 (10)	
Treonina	2,77	2,97 (2) (6)	3,3
		2,46 (10)	
Valina	4,59	4,50 (2) (6)	3,6
		4,31 (10)	
		4,07 (12)	
Leucina	6,51	6,39 (2) (6)	5,8
		6,15 (10)	
		6,52 (12)	
Isoleucina	5,03	3,83 (2) (6)	3,3
		4,50 (10)	
		3,72 (12)	
Metionina	1,64	1,75 (2) (6)	—
		1,23 (10)	
		1,31 (9)	
		1,28 (13)	
Triptofana	1,18	1,09 (2) (6)	1,0
		1,23 (10)	
		1,16 (14)	
Histidina	1,90	1,89 (2) (6)	1-2
		2,46 (10)	
Arginina	4,72	4,72 (2) (6)	2,8 $\pm$ 0,5
		3,07 (10)	

(1) Valores calculados para 16 % de N.
(2) Média de 4 tipos de trigo.

quanto à lisina e treonina, cujas percentagens no glúten e na gliadina são inferiores às da globulina e albumina, como se pode ver na Tabela III.

TABELA III

Percentagem aproximada de lisina e treonina na proteína do trigo

Calculada para 16 % de N

Aminoácido	No grão	No glúten	Na gliadina	Na globulina	Na albumina
Lisina.	2,7 (8)	1,9 (8)	0,5 (8)	3,8 (11)	4,5 (17)
	2,5 (11)	1,6 (15)	0,6 (17)	11,8 (17)	
		1,4 (16)			
Treonina.	3,3 (8)	2,5 (8)	2,7 (8)	—	—
		2,4 (15)			
		2,1 (16)			

Nos aminoácidos cuja percentagem seja mais ou menos a mesma tanto no glúten como nas restantes proteínas, não se verificará qualquer variação com o aumento ou diminuição da proteína total, mantendo-se, pois, mais ou menos constante a percentagem desses aminoácidos em relação à proteína. É o que se passa com os restantes aminoácidos, nos quais se notam apenas ligeiras variações.

Como consequência de a percentagem da lisina na proteína ser menor nos trigos que apresentam maior percentagem de proteína, resulta que o valor biológico da proteína do trigo decresce quando a percentagem da proteína no grão aumenta, visto ser precisamente a lisina o aminoácido essencial limitante do aproveitamento da proteína do trigo. Mas como a lisina no grão aumenta sempre que a proteína também aumenta, isto quer dizer que a diminuição da percentagem da lisina, em relação à proteína, é compensada e excedida pelo acréscimo em proteína total.

Assim, quando a proteína do trigo aumenta, a qualidade da sua proteína diminui, mas, como esta diminuição de qualidade é compensada pela maior quantidade de proteína, resulta que o valor nutritivo do trigo por unidade de peso também aumenta, e será tanto maior quanto maior for a percentagem da sua proteína. O que se ganha em quantidade é, pois, superior ao que se perde em qualidade da proteína.

Os valores encontrados para as duas espécies estudadas: *T. aestivum* e *T. turgidum*, embora o número de trigos analisados, tanto de uma como de outra, seja pouco elevado, parecem mostrar não existirem diferenças nas percentagens dos seus aminoácidos quanto à espécie. As variações encontradas, quer em relação ao trigo, quer à proteína, julgamos serem apenas função da sua proteína total. Assim, o facto dos trigos pertencentes ao *T. turgidum* revelarem maior percentagem de aminoácidos, relativamente aos trigos pertencentes ao *T. aestivum*, pode atribuir-se simplesmente à coincidência de serem eles os que apresentaram também maior percentagem de proteína.

SUMÁRIO

Com o objectivo de ajuizar do valor nutritivo dos trigos cultivados em Portugal procedeu-se à determinação dos aminoácidos essenciais, por métodos microbiológicos, em seis cultivares pertencentes ao *Triticum aestivum* e ao *Triticum turgidum*.

Neste trabalho referem-se e discutem-se os resultados obtidos. Nele se verifica que a percentagem dos aminoácidos essenciais no grão de trigo varia directamente com a proteína e que a percentagem da lisina e da treonina na proteína diminui, quando a proteína total aumenta. Deste facto, e por ser a lisina o aminoácido limitante do aproveitamento da proteína do trigo, resulta que o valor biológico da proteína do trigo varia na razão inversa do seu teor em proteína.

AGRADECIMENTO

Ao Prof. C. A. ELVEHJEM, Chefe do Departamento de Bioquímica da Universidade de Wisconsin, desejamos manifestar os nossos melhores agradecimentos pelo franco acolhimento que nos proporcionou e pelas facilidades dispensadas na realização deste trabalho.

SUMMARY

In order to evaluate the nutritive value of wheats cultivated in Portugal, determination of amino acids, by microbiological methods, have been carried out in six cultivars of wheats (*Triticum aestivum* and *Triticum turgidum*).

This study refers the results obtained. It is shown that the percentage of essential amino acids varies directly with the protein in the wheat and that the percentage of lisine and of threonine in the protein decreases with the increase of the total protein. Consequently, the biological value of the protein of the wheat varies in the inverse ratio of its protein content.

The author wishes to express his gratitude to Prof. C. A. ELVEHJEM, Head of the Department of Biochemistry, University of Wisconsin, for the facilities to carry out this work.

BIBLIOGRAFIA

1. HOGAN, A. G., *et al.*
1955 The percentage of protein in corn and its nutritional properties. *J. Nutrition* **57**: 225-239.

2. PEREIRA, A.
1944 Proteínas do trigo. I. Contribuição para o estudo da variação da proteína e glúten segundo a variedade e a região. *Agron Lusit.*, **6**: 367-396.

3. ———
1946 Proteínas do trigo. II. Sua variação e correlação com produção e peso do hectolitro. *Agron. Lusit.* **8**: 131-146.

4. FLODIN, N. W.
1953 Amino acids and proteins. Their place in human nutrition problems. *J. Agr. Food Chem.* **1**: 222-235.

5. ANÓNIMO
Instruction manual (Microbiological assay). Department of Biochemistry of the University of Wisconsin (Mimeografado).

6. ANÓNIMO
1955 Nutritive value of wheat, flour and bread. Amino acids. Fleischman project n.º 1. Report to the Scientific Advisory Committee. September 19, 1955 (Mimeografado).

7. HENDERSON, L. M. & SNELL, E. E.
1948 A uniform medium for determination of amino acids with various microorganisms. *J. Biol. Chem.* **172**: 15-29.

8. BLOCK, R. J. & BOLLING, D.
1945 *The amino acid composition of proteins and foods.* Charles C. Thomas, Springfield, Ill.

9. MILLER, B. S., SEIFFE, J. Y., SHELLENBERGER, J. A. & MILLER, G. D.
1950 Amino acid content of various wheat varieties. I. Cystine, lysine, methionine, and glutamic acid. *Cereal Chem.* **27**: 96-106.

10. BAUMGARTEN, W., MATHER, A. N., & STONE, L.
1946 Essential amino acid composition of feed materials. *Cereal Chem.* **23**: 135-155.

11. HORN, M. J., JONES, D. B. & BLUM, A. E.
1947 Microbiological determination of lysine in proteins and foods. *J. Biol. Chem.* **169**: 71-76.

12. KUIKEN, K. A., NORMAN, W. H., LYMAN, C. M., HALE, F. & BLOTTER, L.
1943 The microbiological determination of amino acids. I. Valine, leucine, and isoleucine. *J. Biol. Chem.* **151**: 615-626.

13. LYMAN, C. M., MOSELEY, O., BUTLER, B., WOOD, S. & HALE, F.
1946 The microbiological determination of amino acids. *J. Biol. Chem.* **166**: 161-171.

14. GREENE, R. D. & ARCHIE BLACK
1944 The microbiological assay of tryptophane in proteins and foods. *J. Biol. Chem.* **155**: 1-8.

15. PENCE, J. W., MECHAM, D. K., ELDER, A. H., LEWIS, J. C., SNELL, N. S. & OLCOTT, H. S.
1950 Characterization of wheat gluten II. Amino acid composition. *Cereal Chem.*, **27**: 335-341.

16. RICE, A. C. & RAMSTAD, P. E.
1950 Amino acid compositions of wheat and carob glutens. *Cereal Chem.* **27**: 238-243.

17. JONES, D. BREESE
1397 Wheat -- its proteins and nutritional properties. *Cereal Chem.* **14**: 771-782.

A ACÇÃO DA HIDRAZIDA MALEICA NA CONSERVAÇÃO DA BATATA

EFEITO ANTI-ABROLHANTE. ESTUDO COMPARATIVO DA RESPIRAÇÃO (Q_{O_2}), DO TEOR EM ANIDRIDO CARBÓNICO DOS TECIDOS E DA ANATOMIA, EM TUBÉRCULOS TRATADOS E NÃO TRATADOS (1)

POR *J. CONTREIRAS* E *J. E. BAPTISTA*
(Estação Agronómica Nacional, Departamento de Fisiologia Vegetal)

INTRODUÇÃO

O «estado de repouso» ou «estado de dormência» (2) da batata, que segundo os modernos trabalhos de HEMBERG (1949) parece ser determinado por substâncias de crescimento presentes nos tubérculos, é um fenómeno com implicações práticas de tal importância que datam de há mais de meio século os primeiros estudos visando o conhecimento dos factores, directos ou indirectos, susceptíveis de condicionar a sua duração. Assim, SCHMID (1901) concluiu das suas experiências que tanto uma temperatura elevada como um intenso arejamento são essenciais ao abrolhamento dos tubérculos. Segundo este autor, o arejamento actuaria não só por garantir um afluxo de oxigénio adequado, mas também por provocar um aumento da transpiração dos tubérculos. Mais tarde, APPLEMAN (1916) igualmente afirmou que uma maior oxigenação dos tubérculos, produzida pela remoção da epiderme ou aplicação periférica de água oxigenada, acelerava a eclosão dos brolhos.

SMITH (1929) perfilhou também a ideia de percentagens eleva-

---

(1) Embora por circunstâncias de ordem vária, o trabalho aqui descrito só agora seja publicado, a sua realização teve lugar nos anos de 1952 e 1953, não se fazendo por isso referência a quaiquer bibliografia pertinente vinda a lume depois de 1954.

(2) Alguns autores fazem distinção entre «estado de repouso» e «estado de dormência» atribuindo o primeiro a condições ambienciais desfavoráveis e o segundo a uma condição interna da planta, de natureza fisiológica ou estrutural. Porém, neste trabalho, os dois termos em questão são empregados como sinónimos.

de oxigénio poderem abreviar o período de dormência. Note-se, contudo, que a sugestão deste autor não se apoia sobre observações directas, mas sim apenas no facto por ele exposto como se segue: «One should note that in all experiments of this investigation there is a larger oxygen absorption by the tubers subjected to those treatments and conditions which shorten the rest period».

Todas estas conclusões foram, porém, ulteriormente contraditadas pelos resultados obtidos por THORNTON (1933, 1939a e 1939b). Com efeito, os trabalhos deste autor, assentes em sólida base experimental, parecem demonstrar, duma forma bastante convincente, que, ao contrário do que até então se tinha afirmado ou sugerido, percentagens de oxigénio normais ou superiores ao normal, são desfavoráveis ao crescimento dos brolhos em batatas dormentes, enquanto que, ao invés, baixas percentagens do mesmo gás (2-10 %) são susceptíveis de reduzir substancialmente a extensão do período de dormência. Esses trabalhos mostraram ainda que tubérculos dormentes mantidos a 25° C e sujeitos a atmosferas confinadas contendo 20 % de oxigénio e percentagens de anidrido carbónico variando entre 40 e 60 % abrolhavam muito mais ràpidamente do que tubérculos testemunhas colocados em condições normais. O mesmo autor verificou também que durante a armazenagem a periderme dos tubérculos vai-se espessando gradualmente em virtude da formação de novas camadas celulares e da suberização das paredes das células o que, diga-se, já anteriormente tinha sido inferido por SMITH (1929) a partir dos valores obtidos na análise da atmosfera interna de pequenos tubérculos. Daqui resultaria, no decorrer do tempo, um aumento progressivo da resistência oposta pela periderme à difusão gasosa e uma consequente descida da concentração interna do oxigénio dando lugar a teores deste gás insusceptíveis de impedir o abrolhamento. Portanto, e em resumo, segundo THORNTON, a dormência das batatas estaria associada a uma alta permeabilidade da «casca» dos tubérculos ao oxigénio. Contràriamente, porém, os resultados de BURTON (1950) sugerem, como este próprio autor escreveu, que a concentração de oxigénio, por si, não desempenha qualquer papel na eclosão e cessação da dormência uma vez que determinações da percentagem deste gás na atmosfera interna de tubérculos armazenados mostraram que essa percentagem não variava sensìvelmente no decurso do tempo, o que aliás BURTON (1952) também verificou em relação ao anidrido carbónico de tubérculos não abrolhados. Por outro lado KIDD (1919)

conseguiu retardar ou inibir o abrolhamento de batatas não dormentes colocando-as em atmosferas contendo, respectivamente, 10 % e 20 % de anidrido carbónico. Muito mais tarde, KARDAS e BLOOD (1947) utilizaram igualmente atmosferas enriquecidas em CO_2 — cuja concentracão variou entre 7,6 e 12,5 % — tendo obtido redução sensível no desenvolvimento dos brolhos das duas cultivares de batata ensaiadas.

Além da composição da atmosfera interna dos tubérculos, outros factores parecem, contudo, influenciar a duração do período de dormência da batata. Entre esses factores contam-se como mais importantes o estado de maturação dos tubérculos, a temperatura e humidade do meio ambiente e, finalmente, os tratamentos mecânicos e químicos.

No referente ao primeiro dos factores citados há que mencionar o trabalho de ROSA (1928a) que observou um período de dormência tanto mais prolongado quanto mais imaturos se encontravam os tubérculos na ocasião da colheita. Resultados análogos foram mais tarde obtidos por WRIGHT & PEACOK (1934).

Quanto ao efeito da temperatura ambiente, MÜLLER-THURGAU (1885) foi dos primeiros a considerar o assunto. Com efeito, o referido fisiologista afirmou ter conseguido obter o abrolhamento de tubérculos, imediatamente após um período de armazenagem de 14 dias à temperatura de 0° C. Um ano depois, MÜLLER-THURGAU & SCHNEIDER-ORELLI (1910) tentaram, sem êxito, induzir o abrolhamento em tubérculos mediante a sua imersão, durante uma hora, num banho de água a 35° C, técnica esta criada por MÖLISCH (1909) para quebrar a dormência em ramos de plantas lenhosas. APPLEMAN (1914), por sua vez, verificou aceleração do abrolhamento submetendo tubérculos a 40° C durante oito horas em câmara húmida. Porém, idêntico tratamento operado em câmara séca mostrou-se menos efectivo. Posteriormente, NEWTON (1927), observou que tubérculos prèviamente armazenados a 5° C, durante dez semanas, abrolhavam um pouco mais ràpidamente, depois de plantados, de que outros armazenados a 20° C pelo mesmo espaço de tempo. Os resultados de LOOMIS (1927) estão porém em contradição com os dos autores precedentes, pois este investigador indica temperaturas de armazenamento elevadas (à volta de 30° C) como as mais eficazes na indução do abrolhamento, o que de certo modo é confirmado pelos dados apresentados por ROSA (1928a). De facto, estes últimos mostram que tubérculos «conservados» a 28-30° C

abrolharam, quando plantados, um pouco mais ràpidamente que tubérculos idênticos, sujeitos durante o mesmo espaço de tempo (36 dias) a 4° C.

Considere-se agora o factor humidade. LOOMIS (1927) tendo armazenado, quer nas condições habituais quer envolvendo os tubérculos em musgo húmido, vários lotes de batata, observou que, embora a temperaturas elevadas a humidade tivesse reduzido o engelhamento e podridão dos mesmos, talvez por acelerar a formação da periderme cicatricial, essa humidade não afectou de nenhum modo a duração do período de dormência. Por outro lado, os ensaios realizados por ROSA (1928 a), indicaram que a humidade prevalecente durante o armazenamento pouco efeito teve no repouso vegetativo dos tubérculos tanto a baixa temperatura (4° C) como a alta temperatura (30° C). Contudo, em tubérculos sujeitos a uma temperatura intermédia (22° C), a humidade apressou a germinação dos tubérculos depois de cortados e plantados. SMITH (1929) que colocou uma série de tubérculos em vasos de vidro fechados onde a atmosfera tinha nuns casos a composição do ar e noutros se encontrava enriquecida em oxigénio (60 %), sendo a temperatura de 25° C, verificou que, nestas condições, os tubérculos absorviam muito mais oxigénio quando em atmosfera húmida do que em atmosfera seca, posto que não houvesse grande diferença no referente ao CO_2 libertado. O autor não faz porém referência ao efeito que tiveram os citados tratamentos na dormência das batatas submetidas a estes ensaios. ROSA (1928 a) formulou a hipótese de a humidade além de inibir a ulterior suberização da «casca», ser também susceptível de tornar esta última mais permeável. Contràriamente a esta suposição, o trabalho experimental de THORNTON (1939 b) levou-o a concluir que a humidade facilita, enquanto que a secura retarda, a formação da periderme, razão esta pela qual as batatas armazenadas numa atmosfera húmida abrolham mais ràpidamente de que armazenadas numa atmosfera sêca.

Tendo agora em atenção os tratamentos mecânicos, APPLEMAN (1916) refere que a remoção da «casca» abrevia o período de dormência, observação esta comprovada por THORNTON (1939 b). Segundo este último autor, o facto resultaria do tecido cicatricial (nova periderme), que se desenvolve ràpidamente, ser menos permeável ao oxigénio do que a periderme normal.

Finalmente, no respeitante aos tratamentos químicos, deve-se

em primeiro lugar mencionar que o emprego de drogas com o fim de alterar a duração da dorménci a teve início no começo do presente século com os ensaios de JOHANNSEN (1906) o qual conseguiu forçar o abrolhamento, em lilaz e outras plantas, sujeitando-as a atmosferas contendo determinadas proporções de éter e clorofórmio. Deste modo, abriu-se caminho à aplicação duma série de produtos visando uns o prolongamento do período de dormência, outros, pelo contrário, a sua cessação. No que particularmente respeita à batata, têm sido numerosos os compostos empregados tendo em vista o segundo daqueles objectivos. Assim, MCCALLUM (1909) ensaiou, entre várias substâncias, o brometo de etilo, o cloreto de etileno, a amónia e o tetracloreto de carbono. APPLEMAN (1916) usou, como se referiu, a água oxigenada, enquanto ROSA (1923) recorreu a soluções de nitrato de sódio. Mais tarde ainda, ROSA (1925, 1928 b) fez tratamentos análogos abrangendo, além de algumas substâncias já citadas, a aplicação do etileno, glicol cloridrina e sulfocianetos de sódio e amónio. Foi contudo DENNY (1926 a, 1926 b, 1928 a, 1928 b e 1929) quem alargou o âmbito destes estudos, pois experimentou 224 produtos químicos quanto ao seu efeito na redução do repouso vegetativo da batata, tendo constatado que tanto os vapores de glicol cloridrina como as soluções de sulfocianeto de potássio ou sódio davam bons resultados. Este género de trabalho foi continuado, entre outros, por MILLER (1933) e DENNY & MILLER (1935).

Cabe, por último, referir os trabalhos mais relevantes levados a efeito com o objectivo de prolongar o período de dormência da batata. GUTHRIE (1938 a e 1938 b) foi o primeiro neste domínio a resorrer ao emprego de «substâncias sintéticas de crescimento» (ácido indolacético e α-naftilacetato de potássio), tendo assim conseguido inibir o abrolhamento de tubérculos cortados. Ulteriormente, GUTHRIE (1939 a e 1939 b) verificou que o ester metílico do ácido α-naftilacético tinha igualmente propriedades inibitórias, sendo, além de tudo, suficientemente volátil à temperatura ambiente para poder penetrar, sob a forma de vapor, em tubérculos intactos. GUTHRIE (1939 b) comparou ainda a acção inibidora de várias substâncias no desenvolvimento dos brolhos da batata tendo concluído que, por exemplo, o ácido α-naftilacético tem, relativamente ao aspecto em consideração, um efeito dez vezes superior ao do ácido indolacético. quando ambos se encontram na mesma concentração. DENNY (1942 e 1945) e DENNY, GUTHRIE & THORNTON (1942) alargaram

o âmbito das pesquizas respeitantes ao tratamento com o ester metílico do ácido α-naftilacético e introduziram modificações várias na técnica da sua aplicação. Outros autores, como SWARBRICK (1943), THOMAS & RIKER (1945), DAINES & CAMPBELL (1946), PUJALS, NYLUND & KRANTZ (1947), KARDAS & BLOOD (1947), SMITH, BAEZA & ELLISON (1947), LUCKWILL (1948), GANDARILLAS & NYLUND (1949), SMITH, ELLISON & MC GOLDRICK (1949), MARSHALL & SMITH (1950), ELLISON (1952), ELLISON & CUNNINGHAM (1953), experimentaram uma ou mais das seguintes substâncias de crescimento, também com vista a suprimir ou retardar o abrolhamento da batata: ácido α-naftilacético, ester metílico do ácido naftilacético, 2,4-diclorofenoxiacetato de sódio, ácido indolacético, ester etílico do ácido naftilacético, 2,4,5-triclorofenoxiacetato de sódio, ácido β-naftoxiacético.

Em Portugal, BENEVIDES DE MELLO (1953) ensaiou com bons resultados o feniletilmetano e o isopropil-fenilcarbamato.

Convém ainda referir que tem sido empregado para o mesmo fim o 2, 3, 5, 6-tetracloronitrobenzeno, embora este não se possa considerar uma substância de crescimento. A sua acção anti-abrolhante foi observada pela primeira vez por BROWN (1947) e confirmada posteriormente por outros investigadores entre os quais se podem citar LUCKWILL (1948), ELLISON & CUNNINGHAM (1953) etc.

SCHOENE & HOFFMANN (1949) chamaram a atenção para um outro composto do tipo das substâncias de crescimento, a 1, 2-dihidro-3, 6-piridazinadiona, conhecido vulgarmente por hidrazida maleica e designado pela abreviação de MH, que estes autores verificaram ser capaz de inibir o crescimento apical do tomateiro. Um pouco mais tarde, LEOPOLD & KLEIN (1951 e 1952) demonstraram o carácter anti-auxínico do composto em causa, cujos efeitos, estudados por vários autores, conduziram ao seu emprego como herbicida, regulador da floração e anti-abrolhante. Nesta última qualidade e aplicado sobre a folhagem das plantas em cultura tem sido utilizado na batata, cebola, beterraba sacarina e diversas raízes tuberculosas, mas é sobretudo na batata que a sua acção inibidora tem merecido a atenção dos investigadores agronómicos, cabendo neste capítulo fazer referência aos trabalhos de MARSHALL & SMITH (1951), KENNEDY & SMITH (1951 e 1953) WITTWER & PATERSON (1951), PATERSON, WITTWER, WELLER & SELL (1952), FRANKLIN & THOMPSON (1953) e LONGCHAMP & GAUTHERET (1954).

O trabalho experimental descrito na presente publicação incidiu também sobre a acção anti-abrolhante do MH na batata, e

teve como objectivo principal, mediante a efectivação de alguns ensaios de campo, determinar, nas condições prevalecentes em certas regiões de Portugal, quais a dose do composto e a época de tratamento mais eficazes no sentido de impedir o desenvolvimento de brolhos. Subsidiàriamente, com o fim de contribuir para o esclarecimento do « mecanismo » responsável pelo efeito inibidor do MH na batata, procedeu-se no laboratório aos estudos fisiológicos e observações histológicas abaixo descriminadas.

1) Seguiu-se o curso da taxa transpiratória ao longo do período de armazenamento mediante a determinação de Q_{O_2} ([1]) em amostras de tubérculos tratados e testemunhas retiradas do armazém a intervalos de tempo mais ou menos regulares.
2) Determinou-se o teor ou conteúdo em anidrido carbónico ([2]) dos tecidos de tubérculos normais e submetidos à acção do MH.
3) Finalmente compararam-se as estruturas anatómicas (periderme e cortex) de tubérculos tratados e não tratados.

MATERIAL E MÉTODOS

1) *ENSAIOS DE CAMPO*

Ensaio do Posto Experimental de Culturas Regadas de Alvalade (ano de 1952)

O primeiro ensaio de campo efectuado em 1952 teve caracter mèramente preliminar, incluindo apenas uma aplicação de MH-30 (produto líquido contendo 30 % de sal dietanolamínico da hidrazida maleica) num talhão de 18 m^2 demarcado numa folha cultivada com batateira « Arran-Banner ». Como testemunha, demarcou-se na mesma folha um talhão de igual área, o qual foi sujeito a um tratamento que consistiu na aspersão com água simples.

([1]) Como é sabido $Q_{O_2} = \mu l\ O_2$ absorvido/mg peso seco de tecido/hora.

([2]) De acordo com WARDLAW & LEONARD (1939), designa-se por teor ou conteúdo dos tecidos em anidrido carbónico, a soma das quantidades deste gás presentes nos tecidos sob as três seguintes formas: (1) como gás livre nos espaços intercelulares; (2) em solução nas paredes celulares e protoplasma; (3) em combinação química com determinadas substâncias dos tecidos.

O campo de cultura era constituído pelo talhão D-3 do referido Posto, sendo o solo de textura franca e reacção neutra.

Os tratamentos foram executados no dia 15 de Julho (1952), tendo-se aplicado o MH (substância activa) na concentração de 0,25 %, adicionado de um molhante (Triton X-100) na concentração de 0,1 %.

Quer na pulverização feita com a solução aquosa de MH-30, quer na levada a cabo com água simples, a operação só se deu por terminada quando o líquido empregado começava a escorrer da rama. É óbvio que esta maneira de proceder — que foi aliás seguida por PATERSON *et al.* (1952) — não permite conhecer a quantidade de substância activa administrada por unidade de superfície.

Da colheita, que teve lugar a 24 de Setembro de 1952, retiraram-se duas amostras constituidas respectivamente por batatas provenientes do talhão tratado e do talhão não tratado e ainda uns tantos tubérculos, estes últimos destinados a observações anatómicas e à determinação do Q_{O_2} e do anidrido carbónico contido nos tecidos, a efectuar na Estação Agronómica Nacional para onde foram oportunamente remetidos. As amostras deram entrada cinco dias após o arranque (29 do mesmo mês) num armazém do Posto onde, dispostas a granel, permaneceram até 23 de Abril do ano seguinte (1953) ou seja durante duzentos e dez dias. Decorrido este período, arrancaram-se os brolhos aos tubérculos e pesaram-se separadamente uns e outros.

Ensaio do Posto Experimental de Culturas Regadas de Alvalade (ano de 1953)

Em 1953 fez-se novo ensaio neste Posto, tendo-se desta vez usado o produto designado por MH-40 (substância em pó, contendo 40 % de sal de sódio da hidrazida maleica) que, segundo os fabricantes, oferece a vantagem, relativamente ao MH-30, de ser menos tóxico.

Neste ensaio, os tratamentos, que obedeceram ao critério de empregar quantidades conhecidas e prèviamente fixadas de anti-abrolhante por unidade de superfície, foram em número de três, designadamente 0,5, 1,5 e 2,5 quilos de substância activa (hidrazida maleica) por hectare, tendo sido aplicados simultaneamente em três épocas diferentes, a saber: 17-6-53, 10-7-53, e 14-8-53, isto é, respectiva e aproximadamente, dois meses e meio, três meses e meio e quatro meses após a plantação da batata (cv. «Arran-

-Banner») que teve lugar em 30-3-53. Em cada uma das referidas datas e antes de proceder aos tratamentos pròpriamente ditos, determinou-se por tentativas, empregando água simples, o volume de líquido necessário para aspargir convenientemente (ou seja até a rama das batateiras escorrer, como se disse precedentemente) as plantas ocupando a área relativa a um talhão experimental. Foi, portanto, dissolvidas nesse volume de água que se aplicaram, por talhão, as doses de substância activa correspondentes às diferentes modalidades já mencionadas de 0,5, 1,5 e 2,5 kg/ha.

Como o produto MH-40 inclui na sua formulação um molhante, dispensou-se, consequentemente, a adição de qualquer agente tensio-activo às soluções da hidrazida maleica destinadas a este ensaio.

Afim de obter uma ideia sobre o estado de desenvolvimento dos tubérculos na altura dos dois primeiros tratamentos procedeu-se em ambos os casos ao arranque de um pé de batateira, calibrando-se os tubérculos que dele provinham. Assim, verificou-se que, na data em que se realizou o primeiro tratamento, o eixo maior dos tubérculos variava entre 28 e 80 mm enquanto que no momento do segundo as dimensões desse mesmo eixo variavam entre 46 e 73 mm.

O ensaio foi implantado, como o do ano anterior, num solo de textura franca e reacção neutra (talhão E-1 do referido Posto), tendo-se adoptado o traçado em blocos casualizados, com três repetições. Os talhões de $21{,}4 \times 0{,}70$ m (15 m^2), incluiam apenas uma linha central de plantas com o comprimento do talhão. Entre cada dois talhões do mesmo bloco situavam-se duas linhas servindo de bordadura.

A colheita realizou-se em 14-8-53 tendo-se pesado, nessa altura, os tubérculos provenientes de cada um dos talhões e retirado amostras — uma por talhão — destinadas a avaliar, mercê das suas produções de brolhos ao fim dum determinado período de armazenamento, a acção anti-abrolhante dos tratamentos efectuados. Com esta finalidade foram as citadas amostras expedidas para a Estação Agronómica Nacional em 11 de Setembro (1953), mas como os tubérculos se encontravam em muito más condições de sanidade, devido a uma forte infestação de traça, julgou-se mais conveniente desistir do intento. Daqui resultou que os dados relativos a este ensaio dizem respeito apenas às produções obtidas com os diferentes tratamentos efectuados no campo.

Ensaio do Posto Experimental do Vale do Sado
(ano de 1953)

Neste Posto e no ano indicado, efectuou-se também um ensaio que, se excluirmos uma ou outra diferença, nomeadamente o facto de se ter empregue o MH-30, foi na maioria dos aspectos semelhante ao levado a efeito em Alvalade. Assim, os tratamentos além de terem sido absolutamente idênticos aos referidos precedentemente — 0,5, 1,5 e 2,5 quilos de hidrazida maleica por hectare — foram, como estes, aplicados simultâneamente em três épocas diferentes, no presente caso 9-4-53, 25-4-53 e 13-5-53, isto é, respectivamente cerca de dois meses, um mês e meio e vinte dias antes do arranque das batateiras que se efectuou em 3-6-53. Por sua vez a plantação teve lugar em 10-2-52, sendo a batata da cultivar «Arran-Banner». No referente a fertilização, técnica cultural e tratamentos anti-criptogâmicos, seguiram-se, as normas práticas em uso no Posto para esta cultura.

Como no ensaio realizado em Alvalade, antes de proceder aos tratamentos, determinou-se, em cada uma das datas em que estes se executaram, o volume de água necessário para molhar a rama, volume no qual foram dissolvidas as quantidades de hidrazida maleica correspondentes às três modalidades escolhidas (0,5, 1,5 e 2,5 kg/ha). As soluções de MH-30 utilizadas continham 0,1 % de molhante (Triton X-100).

O ensaio foi implantado num solo turfoso (Folha C do Posto em questão), tendo-se adoptado, como em Alvalade, o traçado em blocos casualizados com três repetições. Quanto a dimensões estas foram as seguintes: talhões 14,0 × 2,5 m; compasso, 0,60 × × 0,40 m.

Quando da colheita, determinaram-se as produções relativas aos diferentes talhões, mediante a pesagem dos respectivos tubérculos, tendo-se retirado, nessa altura, uma amostra das batatas colhidas em cada um destes talhões. Essas amostras, remetidas mais tarde para a Estação Agronómica Nacional, foram aí divididas em dois lotes, em 14-7-53, o primeiro pesando à volta de 5 kg, o segundo, que não foi pesado, constituido pelos restantes tubérculos da amostra inicial. Colocaram-se, em seguida, as batatas em tabuleiros de madeira com 0,555 × 0,365 × 0,100 m, providos de uma divisória central, de modo a ficarem no mesmo tabuleiro, separados por esta divisória, os dois lotes provenientes de cada uma das

amostras, armazenando-se nesse mesmo dia os tabuleiros, em número de trinta, num compartimento com 17 m^3 de cubagem.

O efeito anti-abrolhante dos tratamentos foi avaliado recorrendo aos lotes cujos pesos se determinaram inicialmente (pesos no começo do armazenamento), enquanto que os outros lotes proveram o material necessário às determinações laboratoriais efectuadas ao longo do período de armazenamento. No fim deste período (16-3-54), que durou pràticamente oito meses, os primeiros dos referidos lotes foram de novo pesados, após o que se procedeu ao arranque dos brolhos cujo número e peso também se determinaram. Destacados os brolhos voltaram a pesar-se os mesmos lotes.

Durante o período de armazenamento registaram-se, com intervalos de uma semana, as temperaturas máximas e mínimas verificadas no recinto onde se encontravam as batatas. As médias destas temperaturas foram de 16,3° C para as máximas e de 13,4° C para as mínimas.

II) *DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS*

Determinação da taxa transpiratória

Como se referiu na Introdução, durante o período de armazenamento mediu-se em várias datas, mais ou menos espaçadas, a taxa de absorpção de oxigénio (Q_{O_2}) em tubérculos tratados e não tratados (testemunhas) (1). Para este fim, em cada uma dessas datas, escolhiam-se nos lotes não pesados, resultantes da subdivisão das diferentes amostras, um tubérculo tratado e um tubérculo não tratado dos quais se retiravam, mediante o emprego conjugado de um fura-rolhas e de um micrótomo, uma série de discos com 1 mm de espessura e cerca de 6 mm de diâmetro. A partir dos discos provenientes do tubérculo tratado constituiam-se dois grupos de vinte discos cada, formando-se idênticamente dois outros grupos com o mesmo número de discos obtidos do tubérculo testemunha. Era nestes quatro grupos que se procedia à determinação de Q_{O_2}, recorrendo à técnica manométrica de WARBURG (1928), conforme se encontra descrita nos manuais práticos de DIXON (1951) e UMBREIT *et al.* (1949).

(1) Como é evidente, entende-se aqui, e no seguimento deste trabalho, por tubérculos tratados e não tratados, os tubérculos provenientes respectivamente de plantas aspergidas com MH e plantas testemunhas.

Cada um destes grupos de discos (volume = 592 mm^3) era colocado em seu frasco de Warburg juntamente com 2 cm^3 de água destilada. Realizava-se esta operação logo após o corte dos discos, uma vez que determinações preliminares de Q_{O_2} tinham evidenciado que nas condições experimentais prevalescentes se obtinha um grau de concordância aceitável entre repetições sem recorrer à lavagem prévia dos tecidos em água arejada.

Como absorvente do CO_2 libertado na respiração empregavam-se 0,2 cm^3 de uma solução de (OH)K a 20 % embebida nos habituais papeis de filtro (Whatman n.° 40) dobrados em leque.

As determinações de Q_{O_2} foram efectuadas a $30 \pm 0{,}05°$ C, temperatura muito próxima da considerada óptima para a respiração dos tecidos da batata (BOSWELL & WHITING, 1938).

Atingido o equilíbrio térmico, para o que era necessário um período de 20 minutos, iniciavam-se as leituras monométricas feitas com intervalos de 15 minutos e em número de treze para cada determinação de Q_{O_2}. Tomaram-se como medidas da taxa transpiratória (Q_{O_2}) os coeficientes de regressão linear «oxigénio absorvido / tempo».

Os discos utilizados nestas determinações foram retirados de tubérculos provenientes quer do ensaio preliminar realizado em Alvalade (1952), quer do ensaio efectuado no Posto Experimental do Vale do Sado. No primeiro caso as batatas provinham, como é óbvio, dos dois únicos talhões (tratado e testemanha) incluídos no ensaio, encontrando-se incritas no Quadro VI as datas em que tiveram lugar as medições da taxa transpiratória levadas a efeito nos tecidos dessas batatas. No segundo caso (Vale do Sado), os tubérculos usados para o fim considerado pertenciam aos talhões n.^{os} 1, 4, 13, 16, 22 e 30 indicando-se no Quadro IV os tratamentos a que foram sujeitos esses talhões e no Quadro VII as datas correspondentes a cada um dos valores de Q_{O_2} obtidos com este material.

Determinação do anidrido carbónico contido nos tecidos

Nas determinações do anidrido carbónico contido nos tecidos de tubérculos tratados e não tratados efectuadas a título comparativo, seguiu-se o método habitual de extracção pelo álcool fervente e subsequente fixação do gás libertado numa solução apropriada tendo-se usado para este fim o aparelho descrito por WARDLAW & LEONARD (1939).

A quantidade de material usado variou, conforme os casos, entre 40 e 120 g e o tempo de extracção foi, salvo duas ou três excepções, de quatro horas. Para a extracção empregaram-se sempre 200 cm^3 de álcool absoluto o qual se obteve destilando álcool a 95 % em presença de cal viva.

O anidrido carbónico era recebido em tubos de Pettenkoffer contendo uma solução $\frac{N}{15}$ de $(OH)_2Ba$ com Cl_2Ba. Os tubos eram mudados hora a hora e a barita titulada com ClH $\frac{N}{10}$ em em presença da fenolftaleína, expremindo-se em mg de CO_2 o volume de ácido gasto nessa titulação. Aos valores assim obtidos deduzia-se o número de miligramas de CO_2 inicialmente contidos na atmosfera do balão e dissolvidos no álcool, quantidades estas prèviamente determinadas por meio de uma série de ensaios em branco que envolviam os mesmos 200 cm^3 de álcool mas em que evidentemente não figuravam os tecidos. Os resultados eram finalmente reduzidos a mg CO_2 por 100 g de peso verde de tecido.

Preparações histológicas

O estudo comparativo das estruturas de tubérculos tratados e não tratados foi feito através da observação microscópica de «cortes», corados pela violeta de genciana e montados em bálsamo do Canadá, obtidos por meio de micrótomo em tecidos prèviamente desidratados e incluidos em parafina.

RESULTADOS E CONCLUSÕES

I) *ENSAIOS DE CAMPO*

Ensaio do Posto de Culturas Regadas de Alvalade (ano de 1952)

Considerando em primeiro lugar as produções obtidas neste ensaio verifica-se que no talhão tratado houve uma quebra de produção de 20 % relativamente à do talhão testemunha (Quadro I).

Embora o esquema simplista em que assentou o ensaio — nomeadamente a ausência de repetições — não permita tirar quaisquer conclusões fundamentadas, este resultado não deixa contudo de sugerir um efeito adverso do MH-30, quiçá devido ao seu emprego em excesso uma vez que no presente caso, conforme se referiu na secção anterior, a quantidade aplicada não foi calculada por unidade de superfície. Aliás a suposição da referida quebra de rendimento ser devida à acção da hidrazida maleica é apoiada pelos dois seguintes factos: (1) a percentagem de batata porqueira

QUADRO I

Produções obtidas nos talhões tratado e não tratado no ensaio efectuado com MH-30 no Posto Experimental de Culturas Regadas de Alvalade (1952)

Tratamentos	Data da aplicação	Data da colheita	Área dos talhões (m2)	PRODUÇÃO	
				Kg / talhão	Kg / hectare (calculada)
MH-30 (0,25 %)	15-7-52	24-9-52	18	50	27777
Testemunha	15-7-52	24-9-52	18	60	33333

ter sido muito mais elevada na produção resultante do talhão tratado, de tal modo que nas amostras retiradas para armazenamento duma e doutra produções a percentagem em causa foi respectivamente de 35,6 % e 3,7 % (Quadro II); (2) as batatas tratadas apresentarem-se no fim do armazenamento menos túrgidas e com peor aspecto (quase invendáveis) do que as não tratadas.

QUADRO II

Peso (Kg) de tubérculos, brolhos e respectivas percentagens, em amostras tratadas e não tratadas. Ensaio efectuado com MH-30 no Posto Experimental de Culturas Regadas de Alvalade (1952)

Qualidade da batata	Amostra tratada com MH-30			Amostra não tratada		
	Tubérculos	Brolhos	Totais	Tubérculos	Brolhos	Totais
Grada	4,155 99,87	0,005 0,12	4,160 99,99	7,104 98,12	0,136 1,87	7,240 99,99
Porqueira	2,294 99,73	0,006 0,26	2,300 99,99	0,270 98,18	0,005 1,81	0,275 99,99
Totais	6,449 99,82	0,011 0,17	6,460 99,99	7,374 98,12	0,141 1,87	7,515 99,99

Quanto ao efeito do MH-30 no abrolhamento dos tubérculos pertencentes às duas amostras armazenadas durante 210 dias, os dados que se encontram no Quadro II mostram que o peso dos

brolhos, expresso em percentagem do peso total da respectiva amostra, é, nas batatas tratadas, aproximadamente dez vezes menor do que nas batatas não tratadas (0,17 % contra 1,87 %).

Ensaio do Posto de Culturas Regadas de Alvalade (1953)

Os valores das produções correspondentes aos diferentes talhões encontram-se no Quadro III.

A análise de variância dos dados obtidos mostra que para o nível de 5% os tratamentos ensaiados não diferem significativamente ($F = 1,33$), ou por outras palavras, os resultados do ensaio permitem concluir que nas condições em que o mesmo se efectuou é improvável que as modalidades de MH-40 aplicadas tenham exercido qualquer efeito na produção.

Não se apresentam aqui quaisquer dados relativos ao efeito anti-abrolhante do MH-40 uma vez que as razões expostas precedentemente (cf. pág. 309) impediram a sua apreciação.

Ensaio do Posto Experimental do Vale do Sado (1953)

No Quadro IV, apresentam-se as produções referentes a este ensaio.

A respectiva análise de variância mostra que, para o nível de 5 % os tratamentos ensaiados, ao contrário do que se verifica no enaaio anterior, diferem significativamente ($F = 2,618$) o que equivale a dizer que, nas condições prevalecentes, as modalidades de MH-30 aplicadas influenciaram significativamente a produção.

A aplicação do test t permitiu concluir que os tratamentos ensaiados não diferem significativamente da testemunha. Contudo há em alguns casos diferenças significativas, por um lado entre as produções correspondentes a doses diversas de MH aplicadas na mesma data, por outro lado entre as produções relativas a uma mesma dose deste composto aplicada em fases diferentes do ciclo vegetativo da batateira.

Assim verifica-se que:

a) Na primeira época (9-4-53) a dose de 2,5 kg/ha reduziu significativamente o rendimento relativamente às doses de 0,5 kg/ha e 1,5 kg/ha.
b) Na segunda época (25-4-53) a produção correspondente à dose de 1,5 kg/ha é significativamente mais

QUADRO III

Produções em kg/talhão obtidas no ensaio efectuado no Posto Experimental de Culturas Regadas de Alvalade (1953)

Número do talhão	Modalidade		Produção		
	Dose	Época	Grada	Porqueira	Total
3			30,00	3,10	33,10
20	2,5 kg/ha		44,00	1,80	45,80
24			48,25	1,80	50,05
4			44,00	1,90	45,90
18	1,5 kg/ha	17-6-53	42,50	1,90	44,40
25			47,00	0,50	47,50
2			37,50	1,50	39,00
15	0,5 kg/ha		41,50	1,10	42,60
26			47,50	2,00	49,50
9			33,50	2,50	36,00
16	2,5 kg/ha		35,20	3,50	38,70
30			46,70	2,20	48,90
10			39,50	2,20	41,70
13	1,5 kg/ha	10-7-53	44,50	1,90	46,40
23			48,00	1,20	49,20
6			37,50	1,20	38,70
19	0,5 kg/ha		45,00	2,00	47,00
21			52,50	1,75	54,25
7			44,00	1,10	45,10
17	2,5 kg/ha		44,00	1,00	45,00
22			49,05	1,60	50,65
8			44,50	1,40	45,90
14	1,5 kg/ha	14-8-53	44,00	1,80	45,80
28			40,00	1,50	41,50
5			43,50	2,60	46,10
11	0,5 kg/ha		49,70	1,80	51,50
27			50,00	0,50	50,50
1			42,50	2,40	44,90
12	Testemunha		46,00	1,30	47,30
29			49,00	1,50	50,50

Bloco 1: Talhões 1 a 10.
Bloco 2: Talhões 11 a 20.
Bloco 3: Talhões 21 a 30.

QUADRO IV

Produções em kg / talhão obtidas no ensaio efectuado no Posto Experimental do Vale do Sado (1953)

Número do talhão	Modalidade		Produção		
	Dose	Época	Grada	Porqueira	Total
1			116,0	17,5	133,5
16	2,5 kg / ha		143,5	10,0	153,5
22			126,0	9,0	135,0
7			152,0	15,0	167,0
20	1,5 kg / ha	9-4-53	163,0	7,0	170,0
25			138,0	5,5	143,5
5			152,0	11,0	163,0
14	0,5 kg / ha		162,0	10,0	172,0
26			155,0	7,5	162,5
9			153,0	10,5	163,5
15	2,5 kg / ha		173,0	11,5	184,5
29			154,0	9,0	163,0
10			149,0	13,0	162,0
19	1,5 kg / ha	25-4-53	150,5	7,0	157,5
21			126,0	5,0	131,0
2			158,0	7,0	165,0
12	0,5 kg / ha		170,0	7,0	177,0
27			158,0	7,0	165,0
3			145,0	8,0	153,0
18	2,5 kg / ha		187,0	6,0	193,0
23			132,0	6,0	138,0
6			161,0	11,0	172,0
11	1,5 kg / ha	13-5-53	140,0	5,0	145,0
24			143,0	6,0	149,0
8			162,0	10,0	172,0
17	0,5 kg / ha		171,0	8,0	179,0
28			165,0	8,0	173,0
4			150,0	11,0	161,0
13	Testemunha		160,0	10,0	170,0
30			136,0	9,0	145,0

Bloco 1: Talhões 1 a 10.
Bloco 2: Talhões 11 a 20.
Bloco 3: Talhões 21 a 30.

Dados relativos ao efeito do MH-30 na conservação de lotes de bat
no Posto Experimen

Número do Talhão	Modalidade		N.º de tubérculos	Peso inicial Kg	Peso final com brolhos Kg	Peso final sem brolhos Kg
	Dose	Época				
1			26	4,953	4,536	4,507
16	2,5 kg/ha		28	5,039	4,547	4,505
22			27	5,034	4,498	4,459
7			37	5,039	4,561	4,466
20	1,5 kg/ha	9-4-53	29	5,030	4,522	4,414
25			22	4,954	4,410	4,251
5			28	4,937	4,202	3,899
14	0,5 kg/ha		27	4,960	4,122	3,961
26			28	4,976	4,191	3,896
9			26	5,017	4,534	4,470
15	2,5 kg/ha		25	4,977	4,432	4,344
29			29	4,982	4,399	4,291
10			26	4,959	4,374	4,259
19	1,5 kg/ha	25-4-53	25	5,081	4,418	4,276
21			25	4,999	4,472	4,357
2			25	5,038	4,279	3,987
12	0,5 kg/ha		30	4,980	4,180	3,895
27			24	5,022	4,147	3,769
3			28	5,070	4,474	4,357
18	2,5 kg/ha		24	4,929	4,295	4,229
23			27	5,019	4,480	4,332
6			27	4,979	4,342	4,224
11	1,5 kg/ha	15-5-53	26	4,964	4,376	4,258
24			28	4,948	4,292	4,134
8			27	4,974	4,226	3,969
17	0,5 kg/ha		29	4,923	4,081	3,786
28			24	5,011	4,222	3,891
4			30	4,978	4,295	3,922
13	Testemunha		29	4,985	4,026	3,584
30			30	5,089	4,165	3,775

O V

nazenados durante oito meses, provenientes do ensaio efectuado Vale do Sado (1953).

Número de brolhos	Peso dos brolhos (calculado) Kg	N.º de brolhos por tubérculo	Quebra total (% do peso inicial)	Peso dos brolhos (% da quebra total)	Quebra não resultante da formação de brolhos (% do peso inicial)
72	0,029	2,8	9,0	6,5	8,4
125	0,042	4,5	10,6	7,9	9,8
128	0,039	4,7	11,4	6,8	10,7
101	0,095	3,7	11,4	16,6	9,5
127	0,108	4,4	12,2	17,5	9,6
91	0,159	4,1	14,3	22,6	11,0
117	0,303	4,2	21,0	29,2	14,5
109	0,161	4,0	20,1	16,1	16,9
138	0,295	4,9	21,7	27,3	15,8
140	0,064	5,4	10,9	11,7	9,6
155	0,088	6,2	12,7	13,9	11,0
156	0,108	5,4	13,9	15,6	11,7
136	0,115	5,2	14,1	15,9	11,8
136	0,142	5,4	15,8	17,6	13,1
139	0,115	5,6	12,8	17,9	10,5
105	0,292	4,2	20,9	27,8	15,1
123	0,285	4,1	21,8	26,3	16,1
124	0,378	4,4	25,0	30,2	17,4
128	0,117	4,6	14,1	16,4	11,8
129	0,066	5,4	14,2	9,4	12,9
135	0,148	5,0	13,7	21,5	10,7
110	0,118	4,1	15,2	15,6	12,8
126	0,118	4,8	14,2	16,7	11,9
124	0,158	4,4	16,5	19,9	13,3
122	0,257	4,5	20,2	25,6	15,0
140	0,295	4,8	23,1	25,9	17,1
117	0,331	4,9	22,4	29,6	15,8
97	0,373	3,2	21,2	35,3	13,7
96	0,442	3,3	28,1	31,5	19,2
114	0,390	3,8	25,8	29,7	18,2

baixa do que as produções obtidas com as doses de 2,5 kg/ha e 0,5 kg/ha.

c) Na terceira época a dose de 1,5 kg/ha induziu uma quebra significativa na produção relativamente à dose de 0,5 kg/ha.

d) As produções obtidas com a dose de 2,5 kg/ha, na segunda (25-4-53) e terceira (13-5-53) épocas de aplicação são significativamente superiores à produção que resultou do mesmo tratamento quando efectuado na primeira época (9-4-53). Não há porém qualquer outra diferença significativa entre as produções respeitantes a doses iguais aplicadas em datas diferentes.

No que respeita ao efeito dos tratamentos postos em prática, na conservação dos lotes de batata armazenados durante oito meses, os dados pertinentes encontram-se no Quadro V.

A análise estatística incidiu sobre os dados inscritos nas quatro últimas colunas após conversão prévia das percentagens em ângulos (mediante a conhecida transformação angular: angulo = = arc sen $\sqrt{\text{percentagem}}$) mostrando que o ensaio é significativo relativamente ao número de brolhos por tubérculo ($F = 8{,}1$), quebra total em percentagem do peso inicial ($F = 41$), peso dos brolhos em percentagem da quebra total ($F = 18$) e quebra não resultante da formação de brolhos em percentagem do peso inicial ($F = 18$).

A aplicação do ensaio de t permite, em relação aos dados de cada uma das colunas acima referidas, concluir o seguinte:

1) Número de brolhos por tubérculo

a) O número de brolhos foi para todos os tratamentos, com excepção das doses de 2,5 e 1,5 kg aplicadas na primeira época, significativamente superior ao obtido na testemunha.

b) Verificou-se por outro lado, existirem diferenças significativas entre alguns dos tratamentos efectuados na segunda época. Assim, o número de brolhos por tubérculo correspondente à dose de 0,5 kg/ha foi significativamente inferior aos números correspondentes às doses de 1,5 e 2,5 kg/ha.

c) Comparando os dados obtidos com doses iguais aplicadas em datas diferentes verifica-se (1) que o número de brolhos por tubérculo obtido com a dose de 1,5 kg/ha aplicada na primeira e terceira épocas é significativamente inferior ao obtido com a mesma dose na segunda época, (2) que o número de brolhos por tubérculo correspondente à dose de 2,5 kg/ha é, na primeira e terceira épocas em relação à segunda e na primeira em relação à terceira, significativamente inferior.

2) Quebra total em percentagem de peso inicial

a) Em todos os tratamentos, à excepção da dose de 0,5 kg/ha na segunda época, o valor da quebra total em percentagem do peso inicial mostrou-se significativamente inferior ao valor obtido para a testemunha.

b) Na primeira época, a quebra total, em percentagem de peso inicial, correspondente à dose de 2,5 kg/ha é significativamente inferior à verificada para os doses de 0,5 e 1,5 kg/ha. Por sua vez, a quebra correspondente ao tratamento de 1,5 kg/ha é significativamente inferior à resultante do tratamento com 0,5 kg/ha. Na segunda época as quebras totais correspondentes respectivamente às doses de 2,5 e 1,5 kg/ha são significativamente inferiores às verificadas com a aplicação de 0,5 kg/ha. Na terceira época, anàlogamente à anterior, as quebras totais registadas no Quadro V para 2,5 e 1,5 kg/ha são significativamente inferiores às insertas no mesmo Quadro para a dose de 0,5 kg/ha.

c) A comparação entre si dos valores correspondentes a doses iguais ensaiadas em épocas diferentes mostrou: (1) que a quebra total correspondente a 1,5 kg/ha na primeira data da aplicação é significativamente inferior à quebra correspondente à mesma dose aplicada na terceira época; (2) que a quebra em questão é na primeira época significativamente inferior à da terceira, quando se trata da dose de 2,5 kg/ha; (3) que para o mesmo tratamento (2,5 kg/ha), a quebra

total em percentagem do peso inicial é na primeira época significativamente inferior à da segunda época.

3) Quebra não resultante da formação de brolhos em percentagem de peso inicial

a) Com excepção dos valores correspondentes à dose de 0,5 kg/ha na primeira, segunda e terceira épocas, a quebra em questão foi em todos os outros tratamentos significativamente inferior à da testemunha.

b) Dentro de cada uma das três épocas em que o MH foi ensaiado verificou-se que as quebras correspondentes aos tratamentos de 1,5 e 2,5 kg/ha são significativamente inferiores à quebra relativa ao tratamento de 0,5 kg/ha.

c) No referente ao efeito relativo de doses idênticas aplicadas em épocas diferentes verificou-se que: (1) o valor relativo à dose de 1,5 kg/ha aplicada na primeira época é significativamente inferior ao valor obtido com a mesma dose na terceira época; (2) o valor correspondente ao tratamento de 2,5 kg/ha aqlicado na primeira época é significativamente mais baixo que o valor correspondente ao mesmo tratamento efectuado na terceira.

4) Peso dos brolhos em percentagem da quebra total

a) Em todos os tratamentos, exceptuando a dose de 0,5 kg/ha na segunda e terceira épocas, o valor do peso em questão foi significativamente inferior ao valor registado para a testemunha.

b) Comparando, dentro de cada época, os resultados obtidos com as três doses ensaiadas, verificou-se que na primeira época o peso correspondente ao tratamento de 2,5 kg/ha foi significativamente inferior aos pesos correspondentes às doses de 0,5 e 1,5 kg/ha. Na segunda e terceira épocas os resultados foram análogos, pois em ambos os casos os valores relativos aos tratamentos de 1,5 e 2,5 kg/ha mostraram-se significativamente mais baixos que o valor correspondente à dose de 0,5 kg/ha.

c) Confrontando finalmente os resultados provenientes de tratamentos iguais efectuados em épocas diferentes, observa-se que o valor registado para a dose de 2,5 kg/ha na primeira época é significativamente inferior aos valores relativos à mesma dose na segunda e terceira épocas.

Uma apreciação genérica dos resultados que acabamos de referir obtidos através da análise estatística dos dados presentes nos Quadros IV e V, conjugada com o exame dos números que figuram neste último quadro põe em evidência os seguintes pontos fundamentais no que respeita aos efeitos do MH no ensaio em questão.

a) A produção normal da batata não foi afectada pelas doses de MH ensaiadas.

b) As quebras totais sofridas pelos tubérculos em armazém — calculadas em percentagem dos pesos iniciais — foram muito reduzidas pelos tratamentos com MH. O valor desta redução que atingiu, relativamente à testemunha, cerca de 100 % para as doses de 2,5 kg/ha, dum modo geral aumentou significativamente com a quantidade de MH empregada e foi tanto maior quanto mais cedo teve lugar a aplicação da substância inibidora.

c) O peso dos brolhos que, calculado em percentagem da quebra total, nos dá, como é evidente, a medida em que os mesmos brolhos contribuem para as perdas sofridas em armazém, foi menor nos lotes provenientes dos talhões tratados do que nos lotes testemunhas. A diferença entre os valores correspondentes a uns e outros destes lotes foi sempre significativa, à excepção de dois casos, e por vezes da ordem de 300 % (em relação ao menor valor). Aqui também o efeito anti-abrolhante aumentou paralelamente com o quantitativo da dose. Deste modo, foram os tratamentos de 2,5 kg/ha que se mostraram mais efectivos e entre estes o ministrado na primeira época.

d) À diminuição do peso de brolhos (em percentagem da quebra total) resultante dos tratamentos com MH, não correspondeu uma equivalente diminuição no

número de brolhos por tubérculo como em princípio seria de esperar. Assim, não só os valores correspondentes aos diversos tratamentos foram superiores ao obtido para a testemunha — e significativamente superiores, excepto em dois casos, como se referiu — mas ainda, na segunda época, as doses de 1,5 e 2,5 kg/ha induziram um aumento significativo no número em questão relativamente à dose de 0,5 kg/ha. A conclusão, portanto, a tirar destes resultados é que o MH não reduziu o número de brolhos que se desenvolveram nos tubérculos durante o período de armazenagem, embora tenha diminuído grandemente a quebra que a formação desses brolhos representa, quebra essa que no presente ensaio variou entre 6,5 e 35,3 % (Quadro V).

e) As quebras não resultantes da formação de brolhos que no presente caso orçam, em média, por 79 % (Quadro V) das quebras totais, quando expressas também em percentagens dos pesos iniciais, foram igualmente reduzidas pelos tratamentos com MH. Nas doses mais elevadas (2,5 kg/ha) este composto teve por efeito baixar o valor desta quebra de 17,04 % (testemunha) para respectivamente 9,56 % (primeira época), 10,76 % (segunda época) e 11,79 % (terceira época). Aliás, dum modo geral, as quebras consideradas foram tanto menores quanto maior foi a dose aplicada no campo experimental e quanto mais cedo teve lugar esta aplicação. No fim do período de armazenamento tiraram-se as fotografias que se apresentam nas Figuras 1, 2, 3 e 4, fotografias estas que são, por assim dizer, a tradução visual dos resultados expostos precedentemente.

As Figuras 1 e 2 mostram dois aspectos de três lotes de batatas provenientes de talhões tratados com 2,5 kg/ha (dose que, entre todas as empregadas, se revelou mais efectiva tanto na redução do peso de brolhos como, dum modo geral, na das quebras sofridas) respectivamente na primeira, segunda e terceira épocas, ao lado de um lote originário de um talhão testemunha. Estas imagens põem em evidência não só o efeito anti-abrolhante

da dose em questão, mas ainda o facto de este efeito ter sido mais acentuado na primeira época de aplicação.

Fig. 1 — Efeito anti-abrolhante do MH-30. Lotes provenientes de talhões tratados com a mesma dose (2,5 kg/ha). Da esquerda para a direita: Testemunha e aplicações efectuadas, em 13 de Maio, 25 de Abril e 9 de Abril.

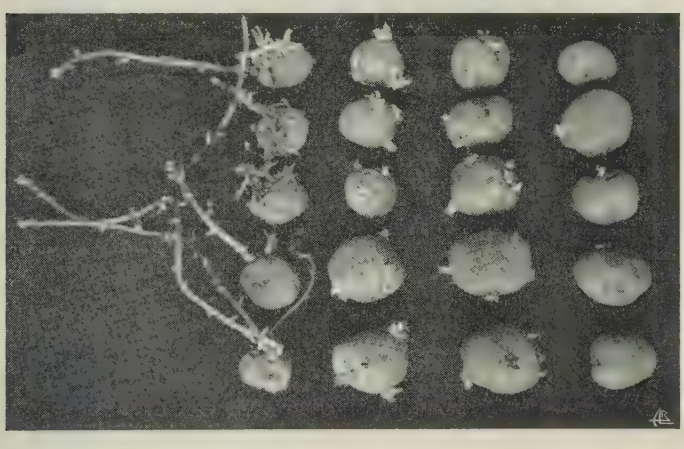


Fig. 2 — Efeito anti-abrolhante do MH-30. Aspecto de detalhe. Amostras dos lotes representados na Fig. 1 (mesma ordem).

Por outro lado as Figuras 3 e 4 mostram dois aspectos de três lotes de tubérculos provenientes respectivamente de talhões tratados com 2,5, 1,5 e 0,5 kg/ha na primeira época, ao lado de um lote testemunha. Neste outro caso é visivel que a um acréscimo das doses de MH aplicadas correspondeu uma intensificação do efeito anti-abrolhante.

Antes de terminar esta secção importa mencionar ainda que, decorrido o período de armazenamento, se procedeu (23-3-54)

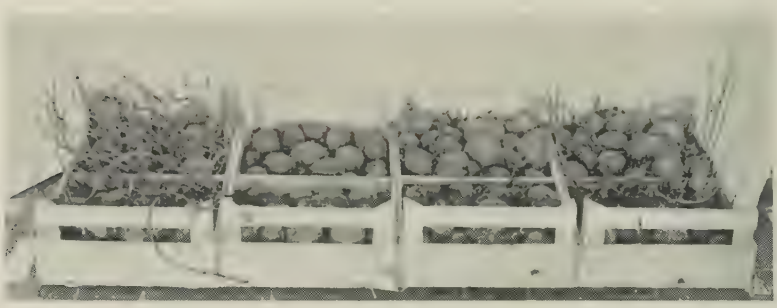


Fig. 3 — Efeito anti-abrolhante do MH-30. Lotes provenientes de talhões tratados na primeira época. Da esquerda para a direita: testemunha e doses de 2,5, 1,5 e 0,5 kg/ha.

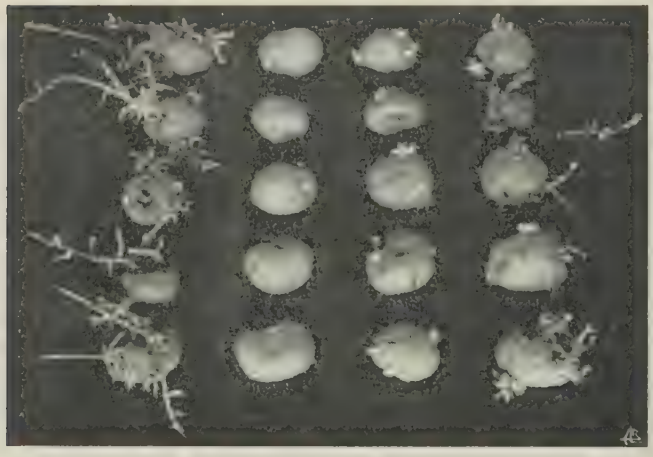


Fig. 4 Efeito anti-abrolhante do MH-30. Aspecto de detalhe. Amostras dos lotes representados na Fig. 3 (mesma ordem).

a um ensaio tendo em vista averiguar se as doses aplicadas de MH alteravam as qualidades culinárias e as propriedades organolépticas normais da batata. Para o efeito fritaram-se e cozeram-se vários tubérculos tratados e não tratados, não se tendo notado qualquer diferença entre uns e outros.

Não foi possível levar a efeito quaisquer ensaios toxicológicos.

II) *DETERMINAÇÕES LABORATORIAIS*

As medições da respiração, como já atrás se mencionou, incidiram tanto sobre o material procedente do primeiro ensaio de Alvalade (1952) como do ensaio do Vale do Sado (1953), enquanto que a determinação do anidrido carbónico interno e o estudo anatómico comparativo dos tecidos foram feitos apenas em tubérculos provenientes do primeiro dos referidos ensaios.

QUADRO VI

Valores da taxa transpiratória determinados em discos de batatas, tratadas e não tratadas, provenientes do primeiro ensaio do Posto Experimental de Culturas Regadas de Alvalade (1952)

Data	Q_{O_2}		$\frac{Q_{O_2}\ (MH\text{-}30)}{Q_{O_2}\ (Test.)} \times 100$
	Testemunha	MH-30	
8-10-52	— 0,60	— 1,03	171,7
9-10-52	— 0,60	— 0,91	151,7
10-10-52	— 0,60	— 1,19	198,3
24-10-52	— 0,47	— 0,82	174,5
14-11-52	— 0,48	— 0,99	206,3
15-12-52	— 0,43	— 1,19	276,7
9-1-53	— 0,35	— 0,48	137,1
29-1-53	— 0,71	— 0,56	78,9
30-1-53	— 0,36	— 0,55	152,8
31-1-53	— 0,50	— 0,48	96,0
25-2-53	— 0,43	— 0,94	218,6

Determinação da Taxa Transpiratória (Q_{O_2})

Os valores de Q_{O_2} obtidos nas determinações efectuadas em discos retirados de tubérculos provenientes do primeiro ensaio de Alvalade (1952) encontram-se no Quadro VI, indicando-se também neste as datas em que essas determinações foram obtidas.

Os números inscritos na última coluna deste Quadro evidênciam o facto de nestas determinações os valores de Q_{O_2} relativos aos tecidos tratados serem, àparte dois casos, muito superiores (137 % a 277 %) aos dos tecidos não tratados. A hidrazida maleica actuou portanto aqui como um acelerador do processo respiratório

embora outros autores como NAYLOR & DAVIS (1951) tenham observado, em determinadas condições (pH = 4), um pronunciado efeito inibitório deste composto na respiração de vários tecidos (extremidades radiculares de ervilha, milho, girasol, tomate, aveia, trigo e cevada). Uma vez que não se procurou estudar as alterações

QUADRO VII

Valores da taxa respiratória determinados em discos de batatas, tratadas e não tratadas, provenientes do ensaio do Posto Experimental do Vale do Sado (1953)

Data	Testemunha		MH-30 (2,5 kg/ha)		$\frac{Qo_2\ (MH\text{-}30)}{Qo_2\ (Test.)} \times 100$
	Número do talhão	Qo_2	Número do talhão	Qo_2	
6-8-53	30	— 0,97	22	— 0,83	85,6
25-8-53	13	— 1,21	16	— 0,93	76,9
1-9-53	4	— 0,65	1	— 0,77	118,5
11-9-53	13	— 0,69	16	— 0,96	139,1
7-10-53	30	— 0,53	22	— 0,51	96,2
8-10-53	4	— 0,55	1	— 0,56	101,8
9-10-53	13	— 0,57	16	— 0,87	152,6
12-11-53	30	— 0,52	22	— 0,47	90,4
14-11-53	4	— 0,38	1	— 0,30	78,9
18-11-53	13	— 0,51	16	— 0,41	80,4
14-1-54	30	— 0,68	22	— 0,37	54,4
19-1-54	4	— 0,65	1	— 0,37	56,9
22-1-54	13	— 0,78	16	— 0,38	48,7

provocadas pelo MH no mecanismo químico da respiração dos tubérculos, é impossível formular qualquer hipótese fundamentada quanto à causa ou causas determinantes dos acréscimos na absorpção do oxigénio registados no Quadro VI.

Antes de passar aos resultados do ensaio seguinte é conveniente apontar que, embora se encontrem citados na literatura pertinente outros casos de aumento da taxa transpiratória em tecidos vegetais devidos à acção de diversos compostos — *vide*, por exemplo, CONTREIRAS (1948), KELLY & AVERY (1949), NEWCOMB (1950), BEEVERS (1953) e CONTREIRAS & BAPTISTA (1954) —, o facto é que essa identidade

de efeitos não oferece qualquer ponto de partida para especular sobre o caso aqui considerado, visto as causas tidas ou sugeridas como responsáveis por esse aumento diferirem conforme a natureza ou tipo das substâncias aplicadas.

Consideremos agora os valores de Q_{O_2} relativos às batatas procedentes do ensaio de Vale do Sado (1953), que se encontram inscritos no Quadro VII. Comparando estes resultados com os anteriores, torna-se aparente a dissemelhança dos efeitos produzidos, num e noutro casos, pelo MH na respiração, pois enquanto nos tubérculos do primeiro dos referidos ensaios se verificou um incremento marcado na taxa de absorpção do oxigénio, a maior parte das determinações efectuadas nos tubérculos do segundo ensaio indicam antes uma diminuição desta taxa, por vezes acentuada (da ordem dos 50 %), por vezes insignificante (≤ 5 %), embora, em pelo menos três ocasiões (1-9-53, 11-9-53 e 9-10-53), a taxa respiratória das amostras tratadas se tenha revelado superior à das amostras não tratadas.

Tendo em atenção os resultados obtidos com a hidrazida maleica, por NAYLOR & DAVIS (1951), e com diversas outras substâncias, pelos autores já mencionados na pág. 328 (1), não repugna atribuir a discrepância verificada entre o efeito do MH na taxa respiratória dos tubérculos dum e doutro dos ensaios considerados a uma diferença de concentração interna deste composto nos tecidos desses respectivos tubérculos, a qual resultaria, por sua vez, da desigualdade das dosagens aplicadas nesses mesmos ensaios. Com efeito, embora, como se salientou anteriormente, não se conheça a quantidade de hidrazida maleica empregada por hectare no primeiro dos ensaios de Alvalade, a verdade é que os factos já atrás apontados, nomeadamente a baixa de produção verificada no talhão tratado, o calibre reduzido das batatas provenientes do mesmo talhão assim como o engelhamento destas últimas ao fim do período de armazenamento, sugerem que a dose aplicada por unidade de superfície foi neste caso superior à do ensaio do Vale do Sado (1953) e talvez excessiva, como oportunamente se referiu (cf. pág. 313).

Os dados do Quadro VII, depois de convenientemente agru-

(1) Estes resultados demonstram a possibilidade de cada um desses agentes químicos agir, conforme o pH ou a concentração, umas vezes como inibidor outras como estimulador da respiração.

pados por pares de valores (tubérculos tratados e não tratados) determinados na mesma data, encontram-se representados gràficamente nas Figuras 5, 6 e 7.

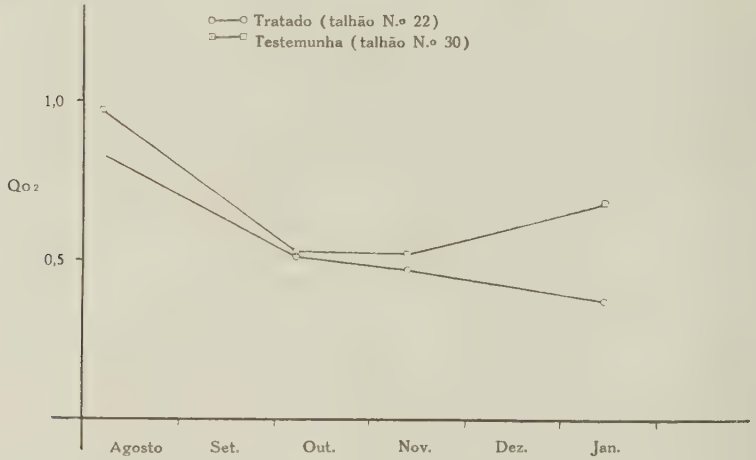


Fig. 5 — Gráfico relativo aos dados do Quadro VII correspondentes aos talhões n.os 22 e 30.

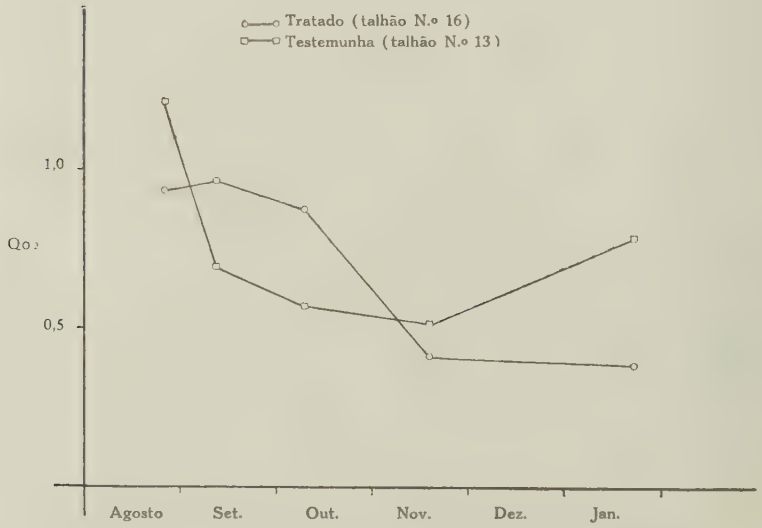


Fig. 6 — Gráfico relativo aos dados do Quadro VII correspondentes aos talhões n.os 16 e 13.

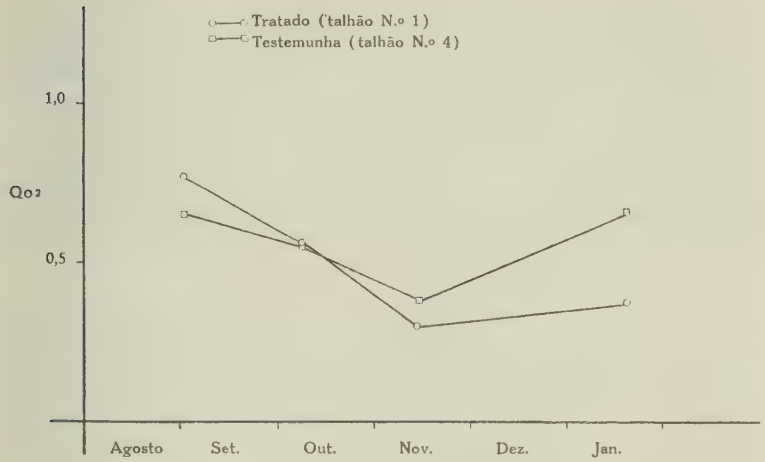


Fig. 7 — Gráfico relativo aos dados do Quadro VII correspondentes aos talhões n.os 1 e 4.

Estes gráficos, que põem em evidência a variação, no decurso do tempo, das taxas respiratórias de amostras tratadas e não tratadas, patenteiam os seguintes pontos de interesse:

a) No que respeita ao exame comparativo das curvas referentes às amostras 30 (testemunha) e 22 (MH) (Fig. 5) é manifesto que enquanto a taxa respiratória da testemunha apresenta um valor inicial um pouco superior ao da amostra tratada e um valor final marcadamente mais alto, pelo contrário nas fases intermédias (7-10-53 e 12-11-53) uma e outra taxas são pràticamente iguais.

b) Quanto às amostras 16 (MH) e 13 (testemunha) (Fig. 6) nuns casos (11-9-53 e 9-10-53) a taxa transpiratória do material tratado é acentuadamente superior à do material não tratado, noutros ligeiramente inferior (18-11-53) e ainda noutros (22-1-54) acentuadamente inferior.

c) Finalmente as curvas relativas às amostras 1 (tratada) e 4 (testemunha), mostram igualdade das taxas transpiratórias em um caso (8-10-53) e um efeito depressivo do MH na mesma taxa em dois dos restantes casos.

O conjunto destes resultados indica, portanto, aparentemente, uma certa tendência das amostras tratadas para respirarem com menos intensidade do que as amostras não tratadas estudadas paralelamente, sobretudo nas fases finais do período de tempo ao longo do qual se escalonaram estas determinações.

Tomando agora em consideração os resultados das determinações efectuadas quer nos tubérculos do primeiro ensaio de Alvalade quer nos do ensaio do Vale do Sado, reputamos lícito tirar as seguintes conclusões gerais:

1) Nos tubérculos em cujos tecidos houve razões para supor que o MH se encontrava numa concentração suficientemente elevada para ter afectado o desenvolvimento dos mesmos, esta substância inibidora produziu um incremento notável da respiração desses tecidos.
2) Porém, quando aplicada na dose de 2,5 kg/ha, a qual teve um efeito altamente eficaz na conservação da batata, a hidrazida maleica, nas condições experimentais prevalecentes exerceu amiùdamente uma acção depressiva, mais ou menos intensa, na respiração dos tecidos. Contudo estes resultados parecem-nos só por si insuficientes, dada até a sua irregularidade, para concluir desde já que a diminuição das quebras observada nos tubérculos tratados depende ou está necessàriamente associada a uma diminuição, provocada pelo MH, na intensidade do processo respiratório ([1]).

Determinação do anidrido carbónico contido nos tecidos

Há razões para supor que no primeiro ensaio de Alvalade (1952) o efeito estimulante provocado pelo MH na absorção do oxigénio pelos tecidos se fez sentir igualmente na produção de

([1]) Uma associação ou dependência desta natureza tem sido invocada para explicar o efeito inibidor do crescimento de um outro composto empregado na batata como anti-abrolhante: o éster metílico do ácido α-naftilacético. Com efeito, alguns autores como GANDARILLAS & NYLUND (1949) verificaram que este reduzia a respiração normal dos tubérculos.

CO_2 (1). Nestas circunstâncias, dado o equilíbrio dinâmico em que o CO_2 interno (CO_2 presente nos espaços intercelulares) se encontra quer com o CO_2 produzido na respiração quer com o CO_2 libertado pelos tecidos (2), seria de esperar um teor deste gás relativamente maior nos tubérculos tratados, a menos que determinado ou determinados factores tendessem nestes tubérculos a deslocar o referido equilíbrio no sentido duma mais rápida libertação do mesmo gás pelos tecidos. Por outras palavras: embora no material tratado a produção de CO_2 fosse muito superior à verificada no material não tratado, nem por isso o CO_2 se acumularia nos tecidos do primeiro, caso nesse material tratado, relativamente à testemunha, a constante de velocidade k_4 tivesse um valor bastante mais elevado do que os das outras constantes que condicionam o equilíbrio expresso no diagrama apresentado na nota 2.

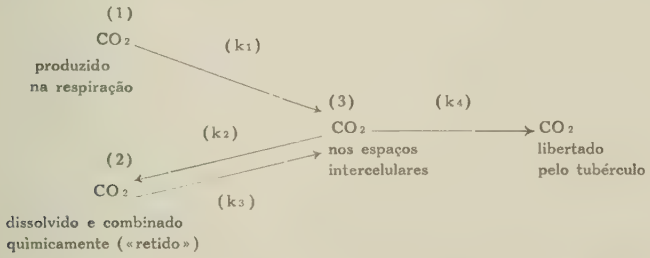
---

(1) Efectivamente, os resultados apresentados abaixo, obtidos numa determinação conjunta de Q_{O_2} e Q_{CO_2}, efectuada pelo «método directo» de Warburg (DIXON, 1951 e UMBREIT *et al.*, 1949) em material tratado e não tratado proveniente deste ensaio, indicam que na realidade assim aconteceu:

Data	Taxa respiratória	Testemunha	Material tratado
30-10-52	Q_{O_2}	— 0,59	— 1,28
30-10-52	Q_{CO_2}	+ 0,53	+ 1,27

Q_{CO_2} simboliza aqui μl de CO_2 exalado na respiração/mg peso seco de tecido/hora.

(2) O seguinte diagrama, devido a BOSWELL & WHITING (1940), mostra as relações que, em qualquer tubérculo, existem entre as diferentes fracções do anidrido carbónico



(2) + (3) = «teor (ou conteudo) dos tecidos em CO_2», segundo WARDLAW & LEONARD (1939).

Faz-se notar que as constantes de velocidade que figuram entre parêntesis não se encontram no diagrama original de BOSWELL & WHITING.

Ora os valores relativos ao CO_2 contido nos tubérculos do ensaio em questão (Quadro VIII), posto que de certo modo irregulares, duma maneira geral indicam que justamente nos tubérculos tratados o teor em CO_2 era comparativamente menor e por vezes bastante menor, do que nos não tratados, sendo portanto lícito

QUADRO VIII

Quantidades de anidrido carbónico contidas nos tecidos de tubérculos, tratados e não tratados, provenientes do primeiro ensaio de Alvalade (1952)

(mg CO_2/100 g peso verde)

Data	Tempo de extracção (horas)	Peso da amostra (g)	MH	Testemunha	$\frac{MH}{Test.} \times 100$
6-12-52	2	50	8,58	13,40	64
9-12-52	4	40	82,13	82,50	99
10-12-52	3	50	11,72	8,39	140
12-12-52	3	120	9,14	8,10	113
17-12-52	4	90	3,07	8,14	38
19-12-52	4	100	18,80	32,78	57
22-12-52	4	100	8,19	16,75	49
23-12-52	4	100	6,39	6,87	93
17-1-53	4	100	5,22	4,81	109
19-1-53	4	100	6,74	8,90	76
20-1-53	4	100	6,31	7,50	84

admitir, em hipótese, que de qualquer modo o MH teve por efeito aumentar o valor da referida constante k_4. Em princípio, este aumento poderia atribuir-se a uma ou ambas das seguintes causas: (1) maior dimensão das lentículas ou maior número destas por unidade de superfície nas batatas tratadas (sugestão devida ao Prof. FLÁVIO RESENDE), (2) maior permeabilidade dos tubérculos tratados, em relação aos não tratados, por não ter lugar o espessamento normal das paredes celulares; alterações anatómicas desta última natureza foram observadas por STRUCKMEYER (1953) nos caules (particularmente na zona cortical) de plantas de *Lilium longiflorum* Thunb. tratadas com MH.

A verificar-se, de facto, uma maior facilidade das trocas gasosas nos tubérculos tratados, quer graças a uma mais elevada

percentagem da área ocupada pelas lentículas, quer graças a uma maior permeabilidade dos tecidos resultante de uma acção retardadora do MH na suberificação da periderme, que, em condições normais, tem lugar no curso de tempo, isto explicaria o efeito inibidor desta substância, caso como THORNTON pensa (cf. pág. 302) a dormência esteja efectivamente associada a uma alta permeabilidade dos tecidos para o oxigénio.

Estudo comparativo da anatomia de tubérculos tratados e não tratados

Como já se referiu atrás, este estudo foi feito em batatas provenientes do primeiro ensaio de Alvalade (1952), batatas essas onde, é conveniente relembrar, a pesar de se ter verificado uma intensidade respiratória muito superior à normal, as quantidades de anidrido carbónico contidas nos tecidos foram marcadamente inferiores às medidas nos tubérculos não tratados.

As observações anatómicas em causa incidiram sobre «cortes» transversais obtidos seis meses, aproximadamente, após o arranque das batatas, sendo necessário salientar, desde já, que destas observações não resultou qualquer ideia precisa quanto à identidade ou diferença de estruturas entre tubérculos tratados e não tratados, uma vez que a excessiva finura dos ditos «cortes» deu lugar a alterações frequentes dessas estruturas o que naturalmente prejudicou grandemente o objectivo em vista. Na medida, porém, em que foi possível julgar pelo exame das preparações histológicas referidas, não se tornaram aparentes quaisquer diferenças no que respeita à espessura das paredes celulares da periderme e do cortex, entre uns e outros tubérculos. Aliás, LONGCHAMP & GAUTHERET (1954) dum modo geral também não notaram alterações da estrutura normal nos tubérculos provenientes de plantas tratadas com MH, a menos que esses tubérculos se apresentassem com a «casca» fendilhada.

Quanto à possibilidade de haver diferenças de número ou de grandeza das lentículas, entre tubérculos tratados e testemunhas, ela só foi considerada muito depois de terminado o trabalho experimental quando já não se dispunha de material para efectuar os necessários cortes tangenciais cujo exame permitiria formar um juizo sobre a validade desta hipótese.

Em face do exposto nesta secção é evidente que permanece em aberto a questão posta acima (cf. págs. 334 e 335) relativa-

mente à possibilidade do efeito inibidor do MH na batata estar ligado a alterações de estrutura provocadas por este composto, que facilitariam as trocas gazosas próprias do processo respiratório.

SUMÁRIO

1 — O presente trabalho cuja parte experimental foi realizada em 1952-53 mas que, por razões de ordem varia, só agora foi possível publicar, teve como objectivo fundamental determinar, em certas regiões do país, quais a dose e a época em que a hidrazida maleica (MH) aplicada no campo à rama da batateira se mostra mais eficaz no sentido de reduzir subsequentemente o abrolhamento e quebras que têm lugar nos tubérculos durante o período de armazenamento.

Para esse efeito efectuaram-se três ensaios de campo. Um em 1952, de caracter preliminar, implantado num solo de textura franca e reacção neutra (do Posto Experimental de Culturas Regadas de Alvalade), incluiu apenas dois talhões, nomeadamente um talhão testemunha e um outro tratado com uma solução de hidrazida maleica (sob a forma de MH-30) na concentração de 0,25 % de substância activa, que se aspergiu sobre as plantas até o líquido escorrer da rama, procedimento este que, como é óbvio, não permitiu conhecer a quantidade de substância activa aplicada por unidade de superfície.

Nos dois restantes ensaios, que tiveram lugar em 1953, um implantado num solo também de textura franca e reacção neutra do mesmo Posto Experimental de Culturas Regadas de Alvalade e outro num solo turfoso do Posto Experimental do Vale de Sado (Marateca), os tratamentos (feitos respectivamente com MH-40 e MH-30) obedeceram ao critério de empregar quantidades conhecidas e de antemão fixadas do anti-abrolhante por unidade de superfície. Esses tratamentos, que foram em ambos os casos em número de três, designadamente 0,5, 1,5 e 2,5 kg/ha de substância activa, aplicaram-se simultâneamente em três épocas diferentes, tendo-se adoptado o traçado em blocos casualizados com três repetições. Antes de proceder aos referidos tratamentos, determinou-se prèviamente, em cada uma das datas em que estes tiveram lugar, o volume de água necessário para molhar a rama, água na qual foram dissolvidas as quantidades de hidrazida maleica correspondentes às três modalidades escolhidas.

2 — Subsidiàriamente, e com o fim de contribuir para o esclarecimento do mecanismo responsável pelo efeito inibidor do MH na batata, determinou-se a taxa respiratória (Q_{O_2}) ao longo do período de armazenamento, e o ter em CO_2, em tubérculos tratados e não tratados assim como se comparou a anatomia de uns e outros destes tubérculos.

3 — Os resulados destes ensaios e as conclusões tiradas foram as seguintes:

Produções — No primeiro ensaio efectuado (1952) verificou-se uma quebra de produção de 20 % no talhão tratado relativamente ao talhão testemunha, resultado este que sugere um efeito adverso do MH quiçá devido ao seu emprego em excesso como levam a supor os seguintes factos: (1) a percentagem da batata porqueira, ter sido muito mais elevada no talhão tratado' (2) os tuberculos tratados apresentarem-se no fim do armazenamento menos túrgidos e com peor aspecto (quase invendáveis) do que os não tratados.

Quanto aos dois últimos ensaios, a análise estatística dos dados obtidos mostrou que em ambos os casos os tratamentos ensaiados não diferem significativamente da testemunha (embora no ensaio do Vale do Sado, difiram significativamente entre si) o que indica que a produção normal de batata não foi afectada pelas doses de MH aplicadas.

Conservação da batata armazenada — No primeiro ensaio (1952), o peso dos brolhos expresso em percentagem do peso total da respectiva amostra foi menor nas batatas tratadas do que nas não tratadas, mas estas últimas, como já se disse, apresentavam-se engelhadas e com muito mau aspecto ao terminar o período de armazenamento.

No segundo ensaio de Alvalade (1953) o mau estado sanitário dos tubérculos devido a um forte ataque de traça, não consentiu uma apreciação do efeito anti-abrolhante do MH.

No ensaio do Vale do Sado o armazenamento dos tubérculos durou oito meses tendo-se, após a obtenção dos resultados pertinentes, analisado estatisticamente os seguintes grupos de dados: número de brolhos por tubérculo, quebra total em percentagem do peso inicial, quebra não resultante da formação de brolhos em percentagem do peso inicial e peso dos brolhos em percentagem da quebra total. Desta análise resultaram as conclusões fundamentais descriminadas abaixo.

a) As quebras totais — calculadas em percentagem dos pesos iniciais — sofridas pelos tubérculos em armazém foram muito reduzidas pelos tratamentos com MH. O valor desta redução que atingiu, relativamente à testemunha, cerca de 100 % para as doses de 2,5 kg/ha, dum modo geral aumentou significativamente com a quantidade de MH empregada e foi tanto maior quanto mais cedo teve lugar a aplicação da substância inibidora.

b) O peso dos brolhos foi menor nos lotes provenientes dos talhões tratados do que nos lotes testemunhas e quase sem excepção significativamente menor. Aqui, também foram os tratamentos de 2,5 kg/ha os que se mostraram mais eficazes e entre estes o ministrado na primeira época (dois meses e meio antes do arranque).

c) À diminuição do peso de brolhos (em percentagem da quebra total) resultante dos tratamentos com MH, não correspondeu uma equivalente diminuição no número de brolhos por tubérculo, cujos valores correspondentes aos diversos tratamentos foram, excepto em dois casos, significativamente superiores aos obtidos para as testemunhas.

d) As quebras não resultantes da formação de brolhos, que orçaram em média por 79 % das quebras totais, foram igualmente reduzidas pelos tratamentos com MH. Dum modo geral estas quebras foram tanto menores quanto maior foi a dose aplicada e quanto mais cedo teve lugar esta aplicação.

4 — Nem as qualidades culinárias nem as propriedades organolépticas dos tubérculos parecem ter sido alteradas pelo tratamento de 2,5 kg/ha.

5 — Embora alguns autores tenham observado, em certas condições (pH = 4), um pronunciado efeito inibitório da hidrazida maleica na respiração de vários tecidos (extremidades radiculares da ervilha, milho, girasol, tomate, aveia, trigo e cevada), o facto é que as determinações da taxa de absorpção de oxigénio (Q_{O_2}) efectuadas manomètricamente em tubérculos, tratados e não tratados, provenientes do primeiro ensaio (Alvalade, 1952), mostram

que o MH provocou neste caso um aumento apreciável desta taxa, aumento este que foi acompanhado de um equivalente incremento da taxa de produção de CO_2 (Q_{CO_2}), como indicam os resultados de uma determinação conjunta de Q_{O_2} e Q_{CO_2} levada a efeito no mesmo material.

Pelo contrário, os valores de Q_{O_2} determinados em material proveniente do ensaio do Vale do Sado, considerados no seu conjunto, indicam, aparentemente, uma certa tendência das amostras tratadas para respirarem com menos intensidade do que as amostras não tratadas, estudadas paralelamente, sobretudo nas fases finais do período de tempo ao longo do qual se escalonaram estas determinações.

Ora, tomando em consideração os referidos resultados de Q_{O_2} obtidos com material de ambos estes ensaios e tendo em conta o facto verificado por outros autores, em relação a vários agentes químicos, de uma mesma substância poder actuar, conforme o pH ou a concentração, umas vezes como inibidora, outras vezes como estimuladora da respiracão, julga-se lícito tirar as seguintes conclusões gerais:

a) Nos tubérculos em cujos tecidos houve razões para supor que o MH se encontrava numa concentração suficientemente elevada para ter afectado o desenvolvimento dos mesmos, esta substância inibidora produziu um incremento notável da respiração desses tecidos.

b) Porém, quando aplicada na dose de 2,5 kg/ha a qual teve um efeito altamente eficaz na conservação da batata, a hidrazida maleica, nas condições experimentais prevalecentes, exerceu amiùdamente uma acção depressiva, mais ou menos acentuada, na respiração dos tecidos. Contudo estes resultados parecem só por si insuficientes, dada até a sua irregularidade, para se poder concluir desde já que a diminuição das quebras observadas nos tubérculos tratados depende ou está necessáriamente associada a uma diminuição, provocada pelo MH, da intensidade do processo respiratório.

6 — Os valores referentes às quantidades de anidrido carbónico contidas nos tubérculos armazenados, colhidos no primeiro ensaio (Alvalade, 1952), indicam, dum modo geral, uma menor acumulação

deste gás nos tecidos tratados do que nos não tratados, isto apesar de, como se viu acima, haver razões para supor que a produção de anidrido carbónico foi muito superior nos primeiros. Para explicar este facto, admite-se, em hipótese, que o MH teve, de qualquer modo, por efeito, aumentar a velocidade com que o anidrido carbónico contido nos espaços intercelulares é libertado pelos tubérculos. Este acréscimo poderia resultar de uma ou de ambas as seguintes causas: (1) maior permeabilidade dos tecidos dos tubérculos tratados, em relação aos não tratados, devido a neles não ter lugar o espessamento normal das paredes das células, alteração anatómica esta que aliás foi observada por STRUCKMEYER em caules de plantas de *Lilium longiflorum* Thunb. tratadas com MH, (2) mais elevada percentagem da área ocupada pelas lentículas nos tubérculos tratados.

Se, na verdade, o MH exercesse sobre a batata uma acção retardadora na suberificação da periderme que, em condições normais, tem lugar no curso do tempo ou, alternativa ou conjuntamente, promovesse a formação de mais ou maiores lentículas, isto, facilitando as trocas gasosas, explicaria a acção inibidora desta substância, caso, como THORNTON pensa, a dormência dos tubérculos esteja efectivamente associada a uma alta permeabilidade dos tecidos para o oxigénio.

7 — Aproximadamente seis meses após o arranque das batatas nascidas no primeiro ensaio (Alvalade, 1952), obteve-se uma série de «cortes», fixados e corados, desse material a fim de comparar a anatomia dos tubérculos tratados e não tratados. Este estudo comparativo foi, porém, muito dificultado, senão impossibilitado, pela excessiva finura dos referidos «cortes» que conduziu a frequentes alterações de estrutura. Todavia, na medida em que foi possível julgar das estruturas dos tubérculos tratados e não tratados, através do exame destas preparações histológicas, não parece haver diferenças, visíveis ao microscópio, quanto à espessura das paredes celulares da periderme de uns e outros desses tubérculos.

Não foi possível verificar se existiam ou não diferenças quanto ao número ou tamanho das lentículas, entre tubérculos tratados e testemunhas, uma vez que este ponto só se pôs à consideração muito depois de terminado o trabalho experimental, quando já se não dispunha de material para efectuar os cortes tangenciais cujo exame se tornava necessário para esclarecer esta questão.

Dadas as circunstâncias adversas aludidas, é evidente que as

observações microscópicas a que se procedeu pouco contribuiram para formar um juízo sobre a possibilidade de o efeito inibidor do MH na batata ser devido a alterações anatómicas provocadas por este composto, as quais facilitariam as trocas gasosas, próprias do processo respiratório. Esta questão permanece por consequência em aberto.

SUMMARY

1 — The experimental work reported here, although only published now, was carried out in 1952 and 1953, chiefly in order to study the anti-sprouting and reducing storage losses effects on potato, of different amounts of maleic hydrazide (MH) applied as a pre-harvest spray on different occasions during the growing period, so as to find out whether practical results could be secured under certain local conditions prevailing in this country.

For this purpose three field trials were performed. The first one in 1952, of an exploratory type, where MH was sprayed in a solution containing 2500 p. p. m. of this compound. In this particular experiment the amount of maleic hydrazide applied by unit area was not known. The other two field trials, both conducted in 1953, followed the plan of applying known and pre-established amounts of MH per hectare (dissolved in an adequate volume of water), namely 0.1, 1.5 and 2.5 Kg/ha, simultaneously at three different dates. Treatments were replicated thrice in randomised blocks.

2 — Samples of the potatoes harvested in each of the experimental plots of these field trials, were subsequently stored and storage losses, including those due to sprouting, estimated at the end of the storage period.

3 — Eventually, in order to further our knowledge of the mechanism responsible for the inhibition of sprouting induced by MH, the following laboratory measurements and observations were carried out in tubers removed from store: (i) manometric determination of the rate of oxygen uptake (Q_{O_2}), at several occasions throughout the storage period, in discs of treated and untreated potatoes both from the first field trial (1952) and from one of the 1953 field trials, and an occasional determination of the rate of carbon dioxide output in potato discs also from the first field trial, (ii) determination of the carbon dioxide tissue content

both in treated and untreated stored potatoes from the first field trial, (iii) comparative examination of the anatomy of stored potatoes from the first field trial.

4 — The data obtained in the field trials and subsequent storage tests seem to allow the following conclusions:

a) Apparently the amount of MH applied in the first field trial (1952) was in excess, judging not only by a 20 % reduction in the yield of the treated plants but also because there was a comparatively higher percentage of small sized treated tubers, without commercial value, which besides were very often shrivelled.

In spite of these adverse effects, the weight of sprouts, taken as a percentage of total weight of the corresponding potato samples, was, at the end of storage, ten times smaller in the treated tubers than in the untreated ones.

b) In the other two field trials, analysis of variance showed that there was no significant difference between the yields of treated and untreated plots, thus indicating that yield was not affected by the application of MH at the rates of 0.5, 1.5 and 2.5 kg/ha.

c) On the other hand MH aplied at the rates of 0.1, 1.5 and 2.5 kg/ha, reduced significantly, according to statistical analysis, the development of sprouts, though not their number, and the losses occurring during storage. The reduction was most marked (more than 100 % for total losses) for 2.5 kg/ha, when sprayed two months and a half before harvest.

5 — In so far as the laboratory determinations are concerned, the results obtained and the conclusions drawn were the following:

a) In the potatoes from the first field trial (1952) the rate of oxygen uptake was consistently higher in the treated tubers, as compared with the untreated ones. This increase in oxygen uptake was accompanied by an equivalent increase of the CO_2 output in the same tubers. There are reasons to believe that the greater rate of respiration observed in this case may have

been due to a high internal concentration of MH in the tissues, so high that it affected the development of the tubers.

b) On the other hand the values of Q_{O_2} obtained in potatoes coming from plots treated with 2.5 kg/ha MH, suggest that the respiration rate was somewhat depressed by this treatment chiefly at the later stages of the storage period, though these same values do not seem consistent enough to permit the conclusion that MH acts as an inhibitor by slowing down the respiratory process.

c) Although, as was stressed above, the stored treated potatoes harvested in the first field trial respired at a rate much above normal, these potatoes contained markedly less carbon dioxide in their tissues than those untreated. These results suggest that somehow carbon dioxide was liberated at a higher rate in the treated potatoes for which two possible explanations were advanced: (i) greater permeability of tissues treated with MH, owing to the lack of thickening of the periderm that, in course of time, takes place in normal tubers (an anatomical modification of this kind in MH treated plants, was observed by STRUCKMEYER in stems of *Lilium longiflorum* Thunb.), (ii) greater area occupied by lenticels in the treated tubers.

It is clear that if any one or both of these structural modifications proved to occur in treated plants, the skin of these potatoes would keep, throughout storage, an adequate flux of the oxygen absorbed in respiration with which THORNTON associates dormancy in potatoes, so that these modifications could reasonably be regarded as possible and indirect sources of the anti-sprouting action of maleic hydrazide.

d) Examination under the microscope of transverse sections obtained in treated and untreated potatoes from the first field trial (1952), about six months after harvest, actually did not provide a definite response to the hypothesis advanced in c). However as far as one could gather from the examination of these sections (which unfortunately were rather too

thin for a convenient comparative study of the anatomy of the treated and untreated potatoes), the use of maleic hydrazide apparently did not alter the normal anatomical structure either of the periderm or of the cortex of the tubers. Whether or not more or larger lenticels were present in the periderm of the treated potatoes could not be checked by a proper examination of tangential sections of treated and untreated potatoes, since this question only came into consideration long after the end of the experimental work described here, therefore when the experimental material was no longer available.

AGRADECIMENTOS

Cumpre-nos deixar aqui expressos os nossos agradecimentos à Direcção Geral dos Serviços Agrícolas que, por intermédio da Repartição de Culturas Arvenses e Postos de Culturas Regadas de Alvalade e Experimental do Vale do Sado, possibilitou a realização dos ensaios de campo enquadrados no delineamento experimental do presente trabalho. Em particular, há que destacar a valiosa cooperação que em todas as circunstâncias nos foi dispensada pelo Director do Posto de Culturas Regadas de Alvalade Eng. Agr. D. MANUEL DE CASTELLO BRANCO e seu Adjunto Eng. Agr. FRANCISCO LUIS ALVES e as facilidades concedidas pelo Director do Posto do Vale do Sado, Eng. Agr. FRANCISCO PEREIRA SEIA, não esquecendo ainda a colaboração utilíssima do Eng. Agr. ARNALDO DA CUNHA PINHEIRO, ao tempo em serviço neste Posto.

À Repartição dos Serviços Fitopatológicos, ao seu Director Eng. Agr. FRANCISCO ARANHA e ao Eng. Agr. ANTÓNIO CASKAI manifestamos também, aqui, os nossos agradecimentos pela concessão da verba investida na compra dos tabuleiros para armazenamento da batata utilizada nos ensaios de conservação.

Desejaríamos ainda registar nestas linhas a colaboração que nos foi prestada pelo Prof. Dr. FLÁVIO RESENDE no exame das estruturas anatómicas referido no texto e pela sugestão mencionada na pag. 341, e a oferta das amostras de MH-30 e MH-40 pela *Naugatuck Chemical International*, de Connecticut (U. S. A.), cedora, por isso, dos nossos melhores agradecimentos.

Por último, mas sem que tal signifique menos apreço, é nos

grato testemunhar o nosso reconhecimento ao Prof. FERNANDO CAVALHO ARAÚJO, não só por várias sugestões e críticas formuladas durante a preparação do original desta memória, mas também pelo auxílio prestado na análise estatística dos resultados.

BIBLIOGRAFIA

APPLEMAN, C. O.

1914 Biochemical and physiological study of the rest period in the tubers of *Solanum tuberosum*. *Maryland Agric. Exp. Sta. Bull.* **183**: 181-226.

1916 Biochemical and physiological study of the rest period in the tubers of *Solanum tuberosum*. *Bot. Gaz.* **61**: 265-294.

BEEVERS, H.

1953 2,4-Dinitrophenol and plant respiration. *Amer. Jour. Bot.* **40**: 91-96.

BOSWELL, J. G. & WHITING, G. C.

1938 A study of polyphenol oxidase system in potato tubers. *Ann. Bot.*, N. S. **2**: 847-863.

1940 Observations on the anaerobic respiration of potato tubers. *Ann. Bot.*, N. S. 4: 257-268.

BROWN, W.

1947 Experiments on the effect of chlorinated nitrobenzenes on the sprouting of potato tubers. *Ann. Appl. Biol.* 34: 422-429.

BURTON, W. G.

1950 Studies on dormancy and sprouting of potatoes. I. The oxygen content of the potato tuber. *New Phytol.* **49**: 121-134.

1952 Studies on dormancy and sprouting of potatoes. II. The carbon dioxide content of the potato tuber. *New Phytol.* **50**: 287-297.

CONTREIRAS, J.

1948 *The effect of iodoacetate on the respiration of leaves of* Hedera Helix. Thesis, Cambridge University.

CONTREIRAS J. & BAPTISTA, J. E.

1954 The sulphydryl groups in the respiration of the plant cell. *Rapports et Communications. Huitieme Congrès de Botanique, Section* **11**: 110-111.

DAINES, R. H. & CAMPBELL, J. C.

1946 Potato sprouting inhibited by the use of alpha-naphthaleneacetic methyl ester. *Amer. Potato Jour.* **23**: 88-91.

DENNY, F. E.

1926a Hastening the sprouting of dormant potato tubers. *Amer. Jour. Bot.* **13**: 118-125.

1926b Second report on the use of chemicals for hastening the sprouting of dormant potato tubers. *Amer. Jour. Bot.* **13**: 386-397.

1928a Chemical treatments for controlling the growth of buds of plants. *Ind. Eng. Chem.* **20**: 578-581.

1928b The importance of temperature in the use of chemicals for hastening the sprouting of dormant potato tubers. *Amer. Jour. Bot.* **15**: 395-404.

1929 Chemical changes induced in potato tubers by treatments that break the rest period. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **2**: 131-142.

DENNY, F. E.

1942 The use of methyl ester of α-naphthaleneacetic acid for inhibiting sprouting of potato tubers, and an estimate of the amount of chemical retained by tubers. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **12**: 387-403.

1945 Further tests on the use of the methyl ester of alpha-naphthaleneacetic acid for inhibiting the sprouting of potato tubers. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **14**: 15-20.

DENNY, F. E., GUTHRIE, J. D. & THORNTON, N. C.

1942 Effect of the vapor of the methyl ester of α-naphthaleneacetic acid on the sprouting and sugar content of potato tubers. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **12**: 253-268.

DENNY, F. E. & MILLER, L. P.

1935 Further experiments on shortening the rest period of potato tubers. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **7**: 157-181.

DIXON, M.

1951 *Manometric Methods.* University Press, Cambridge.

ELLISON, J. H.

1952 Inhibition of potato sprouting by 2, 3, 5, 6-tetrachloronitrobenzene and methyl ester of A — naphthaleneacetic acid. *Amer. Potato Jour.* **29**: 176--181.

ELLISON, J. H. & CUNNINGHAM, H. S.

1953 Effect of sprout inhibitors on the incidence of Fusarium dry rot and sprouting of potato tubers. *Amer. Potato Jour.* **30**: 10-14.

FRANKLIN, E. W. & THOMPSON, N. R.

1953 Some effects of maleic hydrazide on stored potatoes. *Amer. Potato Jour.* **30**: 289-295.

GANDARILLAS, H. & NYLUND, R. E.

1949 Further studies on the influence of sprout-inhibiting and sprout-inducing treatments, on the growth and yield of potatoes. *Amer. Potato Jour.* **26**: 7-16.

GUTHRIE, J. D.

1938a Effect of ethylene thiocyanohydrin ethyl carbylamine, and indoleacetic acid on the sprouting of potato tubers. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **9**: 265-272.

1938b Inducing «dormancy» in potato tubers with potassium naphthalene acetate and breaking it with ethylene chlorohydrin. *Science*, **88**: 86.

1939a Inhibition of growth of buds of potato tubers with the vapour of the methyl ester of naphethaleneacetic acid. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **10**: 325-328.

1939b Control of bud growth and initiation of roots at the cut surface of potato tubers by treatment with growth-regulating substances. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **11**: 29-53.

HEMBERG, T.

1949 Significance of growth-inhibiting substances and auxins for the rest--period of the potato tuber. *Physiol. Plant.* **2**: 24-36.

JOHANNSEN, W.

1906 *Das Aether-Verfahren beim Frühtreiben mit besonderer Berücksichtigung der Fliedertreiberei.* Gustav Fischer, Jena.

KARDAS, L. T. & BLOOD, P. T.
1947 Retardation of sprouting of potatoes by carbon dioxide storage. *Amer. Potato Jour.* **24**: 39-47.

KELLY, S. & AVERY JR., G. S.
1949 The effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and other physiologically active substances on respiration. *Amer. Jour. Bot.* **36**: 421-426.

KENNEDY, E. J. & SMITH, O.
1951 Response of the potato to field application of maleic hydrazide. *Amer. Potato Jour.* **28**: 701-712.
1953 Response of seven varieties of potatoes to foliar applications of maleic hydrazide. *Proc. Amer. Soc. Hort. Sci.* **61**: 395-403.

KIDD, F.
1919 Laboratory experiments on sprouting of potatoes in various gas mixtures (Nitrogen, oxygen and carbon dioxide). *New Phytol.* **18**: 248-252.

LEOPOLD, A. C. & KLEIN, W. H.
1951 Maleic hydrazide as an antiauxin in plants. *Science*, **114**: 9-10.
1952 Maleic hydrazide as an anti-auxin. *Physiol. Plant.* **5**: 91-99.

LONCHAMP, R. & GAUTHERET, R. J.
1954 Recherches sur la conservation des pommes de terre par l'hydrazide maléique. *Ann. Agron.* (série A). 5e Année: 207-224.

LOOMIS, W. E.
1927 Temperature and other factors affecting the rest period of potato tubers. *Plant Physiol.* **2**: 287-302.

LUCKWILL, L. C.
1948 The suppression of sprouting in ware potatoes. *Ann. Rep. Long Ashton Res. Sta.*: 124-129.

MARSHALL, E. R. & SMITH, O.
1950 Effect of field and storage aplications of sprout inhibitors of potato tubers. *Amer. Potato Jour.* **27**: 133-141.
1951 Maleic hidrazide as a sprout inhibitor for potatoes. *Bot. Gaz.* **112**: 329-330.

McCALLUM, W. B.
1909 *in Ann. Rept. Arizona Agr. Exp. Sta.* **11**: 584-586.

MELLO, A. BENEVIDES DE
1953 *A acção anti-abrolhante do feniletiluretano e do isopropilfenilcarbamato na conservação da batata de consumo em armazém.* Relatório dactilografado. Estação Agrária do Porto.

MILLER, L. P.
1933 Effect of sulphur compounds in breaking the domancy of potato tubers and in inducing changes in the enzyme activities of treated tubers. *Contr. Boyce Thompson Inst.* **5**: 29-82.

MOLISCH, H.
1909 *Das Warmbad als Mittel zum Treiben der Pflanzen.* Gustav Fischer, Jena.

MÜLLER-THURGAU, H.
1885 Beitrag zur Erklärung der Ruheperioden der Pflanzen. *Landw. Jahrb.* **14**: 851-907.

MÜLLER-THURGAU, H. & SCHNEIDER-ORELLI, O.
1910 Beiträge zur Kenntnis der Lebensvorgange in ruhenden Pflanzenteilen. *Flora*, **101**: 309-372.

NAYLOR, A. W. & DAVIS, E. A.
1951 Respiration response of root tips to maleic hydrazide. *Bull. Torrey Botanical Club*. **78**: 73-79.

NEWCOMB, E. H.
1950 Tobacco callus respiration and its response to 2,4-dinitrophenol. *Amer. Jour. Bot.* **37**: 264-271.

NEWTON, W.
1927 Metabolism of nitrogen compounds in dormant and nondormant potato tubers. *Journ. Agr. Res.* 35: 141-146.

PATTERSON, D. R., WITTWER, S. H., WELLER, L. E. & SELL, H. M.
1952 The effect of preharvest foliar sprays of maleic hydrazide on sprout inhibitition and storage quality of potatoes. *Plant Physiol.* **27**: 135-142.

PUJALS, E. A., NYLUND, R. E. & KRANTZ, F. A.
1947 The influence of sprout-inhibiting and sprout-inducing treatments on the growth and yields of potatoes. *Amer. Potato Jour.* **24**: 47-56.

ROSA, J. T.
1923 Abbreviation of the dormant period in potatoes. *Proc. Am. Soc. Hort. Sci.* **20**: 180-187.
1925 Shortening the rest period of potatoes with ethylene gas *Potato News Bull.* **2**: 363-365.
1928a Relation of tuber maturity and of storage factors to potato dormancy. *Hilgardia*, **3**: 99-124.
1928b Effects of chemical treatments on dormant potato tubers. *Hilgardia* **3**: 125-142.

SCHMID, B.
1901 Ueber die Ruheperiode der Kartoffelknollen. *Ber. Deut. Bot. Gesellschaft.* **19**: 76-85.

SCHOENE, D. L. & HOFFMANN O. L.
1949 Maleic hydrazide, a unique growth regulant. *Science*, **109**: 588-590.

SMITH, O.
1929 Effects of various treatments on the carbon dioxide and oxygen in dormant potato tubers. *Hilgardia*, **4**: 273-306.

SMITH, O., BAEZA, M. A. & ELLISON, J. H.
1947 Response of potato plants to spray applications of certain growth--regulating substances. *Bot Gaz.* **108**: 421-431.

SMITH, O., ELLISON, J. H. & Mc COLDRICK, F.
1949 Growth of potato sprouts retarded by 2, 4, 5-trichlorophenoxyacetic acid. *Science*, **109**: 66-68.

STRUCKMEYER, B. E.
1953 The effect of maleic hidrazide on the anatomical structure of croft easter lilies. *Amer. Jour. Bot.* **43**: 25-27.

SWARBRICK, T.
1943 The effect of various concentrations of naphthoxyacetic acid and naphthleneacetic acid in inhibiting shoot development in apple, swede, carrot and potato. *Ann. Rep. Long Ashton Res. Sta.*: 25-30.

THOMAS, J. E. & RIKER, A. J.
1945 Sprouting of potatoes inhibited by plant hormones. *Amer. Potata Jour.* **22**: 104-113.

THORNTON, N. C.
1933 Carbon dioxide storage. V. Breaking the dormancy of potato tubers. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **5**: 471-481.
1939a Carbon dioxide storage. XIII. Relationship of oxygen to carbon dioxide in breaking dormancy of potato tubers. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **10**: 201-204.
1939b Oxygen regulates the dormancy of potato. *Contrib. Boyce Thompson Inst.* **10**: 339-361.

UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. & STAUFFER, J. F.
1949 *Manometric Techniques and Related Methods for the Study of Tissue Metabolism.* Burgess Publishing Co., Minneapolis.

WARBURG, O.
1928 *Métabolisme Cellulaire et Métabolisme des Tumeurs.* Travaux du Kaiser Wilhelm Institut Für Biologie traduits par E. AUBEL et L. GENEVOIS. Tome I. Librairie Felix Alcan, Paris.

WARDLAW, C. W. & LEONARD, E. R.
1939 Studies in tropical fruits. IV. Methods, in the investigation of respiration with special reference to banana. *Ann. Bot., N. S.* **3**: 27-42.

WITTWER, S. H. & PATTERSON, D. R.
1951 Inhibition of sprouting and reduction of storage losses in onions, potatoes, sugar beets, and vegetable root crops by spraying plants in the field with maleic hydrazide. *Mich. Agr. Exp. Sta. Quart. Bull.* **34**: 3-8.

WRIGHT, R. C. & PEACOCK, W. M.
1935 Influence of storage temperatures on the rest period and dormancy of potatoes. *U. S. Dept. Agric. Tech Bull.* **424**.

ERRATA

Nas páginas 307, 311, 312, 327, 328 e 331, onde se lê «taxa transpiratória» deve ler-se «taxa respiratória».

No Sumário (linha 18) e na última página do Índice do volume (linha 16) onde se lê HIDRAZINA, deve ler-se HIDRAZIDA.

ÍNDICE DO VOLUME XVIII

DE FLORA LUSITANA COMMENTARII. *Ad normam herbarii stationis agronomicae nationalis* 5

ANSWERING QUERIES ON THE TAXONOMY AND NOMENCLATURE OF SOME GRASSES — C. E. HUBBARD 7

PLANTAS NOVAS E NOVAS ÁREAS PARA A FLORA DE PORTUGAL. III 11

ESTABELECIMENTO DA CAUSA DA FALTA DE REACÇÃO DE UM SOLO PORTUGUÊS ÀS ADUBAÇÕES FOSFATADAS PELA DETERMINAÇÃO DO « VALOR DE LARSEN » — J. M. Arriaga e Cunha 51

OBSERVAÇÕES SOBRE ALGUMAS FORMAS CULTIVADAS DE LINHO PARA ÓLEO. *I. Relação entre os índices de iodo e de refracção* — L. Mercês de Mello e D. Rodrigo de Castro 61

ENSAIO COMPARATIVO DA ACÇÃO DO PARATHION, DIAZINON E DO MALATHION CONTRA AS LARVAS DO *DACUS OLEAE* — Augusto Rosa de Azevedo 75

DE FLORA LUSITANA COMMENTARII. *Ad normam herbarii stationis agronomicae nationalis* 83

UMA *ELEOCHARIS* NOVA PARA A FLORA PORTUGUESA — V. Rainha 85

ON THE NOMENCLATURE OF *CYTISUS STRIATUS* (HILL) ROTHM. AND ITS VARIETIES — V. H. Heywood. . . 87

AJUGA OCCIDENTALIS SP. N. — J. Braun-Blanquet . . . 89

L'*ARTEMISIA TOURNEFORTIANA* REICHB. AU PORTUGAL — A. Lawalrée. 92

NOUVELLE CONTRIBUTION POUR LA CONNAISSANCE DES *TARAXACA* DU PORTUGAL — J. L. Van Soest . . . 94

ÍNDICE DOS TAXA TRATADOS NOS PRIMEIROS DEZ FASCÍCULOS 99

FUNGI LUSITANIAE. XIV — Maria Tereza Lucas 109

NOTA SOBRE AUTOPOLIPLOIDIA INDUZIDA EM *LUZULA CAMPESTRIS* DC. — D. Castro e M. Noronha-Wagner 123

CORRECÇÃO DA ESTRUTURA DE UM SOLO ÁCIDO. *Estudo laboratorial* — Francisco Manuel Vieira de Brito 127

MODIFICAÇÃO DA MODALIDADE ORIGINAL DO « MÉTODO DE HOMÈS ». *Primeiros ensaios de adubação baseados nesta nova forma do método* — J. Contreiras, J. E. Baptista, J. M. Arriaga e Cunha e J. Perdigão 151

RESULTATS DE DEUX EXCURSIONS GEOBOTANIQUES A TRAVERS LE PORTUGAL SEPTENTRIONAL ET MOYEN. II. *Chenaies à feuilles caduques* (Quercion occidentale) *et chenaies à feuilles persistantes* (Quercion fagineae) *au Portugal* — J. Braun-Blanquet, A. R. Pinto da Silva et A. Rozeira 167
FUNGI LUSITANIAE. XV — Maria Rosália de Sousa Dias. 237
KARYOTYPIC VARIATION IN PTERIDOPHYTA AND THEIR SIGNIFICANCE — Arun Kumar Sharma and Arati Majumdar 243
SECONDARY CENTRIC ACTIVITY IN AN HYBRID OF *TRITICUM* AND *ÆGILOPS* — M. Noronha-Wagner 251
MALE STERILITY IN PALMS — Santosh Kumar Sarkar 257
SOBRE *OXALIS CERNUA* THUNB. *Um estudo sobre o seu valor em vitamina C* — Delmiro Modesto Sieiro 273
PROTEÍNAS DO TRIGO. *Aminoácidos essenciais de alguns trigos cultivados em Portugal* — A. Pereira 285
A ACÇÃO DA HIDRAZINA MALEICA NA CONSERVAÇÃO DA BATATA. *Efeito anti-abrolhante. Estudo comparativo da respiração (Q_{O_2}), do teor em anidrido carbónico dos tecidos e da anatomia, em tubérculos tratados e não tratados* — J. Contreiras e J. E. Baptista 301

PUBLICAÇÃO DA
DIRECÇÃO GERAL DOS SERVIÇOS AGRÍCOLAS
Repartição de Estudos, Informação e Propaganda

SUMÁRIO

Dias, Maria Rosália de Sousa — FUNGI LUSITANIAE-XV 237-242

Sharma, Arun Kumar and Arati Majumdar — KARYOTYPIC VARIATION IN PTERIDOPHYTA AND THEIR SIGNIFICANCE 243-249

Wagner, M. Noronha- — SECONDARY CENTRIC ACTIVITY IN AN HYBRID OF *TRITICUM* AND *ÆGILOPS* 251-255

Sarkar, Santosh Kumar — MALE STERILITY IN PALMS 257-271

Sieiro, Delmiro Modesto — SOBRE *OXALIS CERNUA* THUNB. — UM ESTUDO SOBRE O SEU VALOR EM VITAMINA C 273-283

Pereira, A. — PROTEÍNAS DO TRÍGO — AMINOÁCIDOS ESSENCIAIS DE ALGUNS TRIGOS CULTIVADOS EM PORTUGAL 285-300

Contreiras, J. e J. E. Baptista — A ACÇÃO DA HIDRAZINA MALEICA NA CONSERVAÇÃO DA BATATA — EFEITO ANTI-ABROLHANTE. ESTUDO COMPARATIVO DA RESPIRAÇÃO (Q_{O_2}), DO TEOR EM ANIDRIDO CARBÓNICO DOS TECIDOS E DA ANATOMIA, EM TUBÉRCULOS TRATADOS E NÃO TRATADOS 301-349

TODA A CORRESPONDÊNCIA E PERMUTA REFERENTE À AGRONOMIA LUSITANA DEVE SER DIRIGIDA A:

POUR L'ÉCHANGE OU POUR LA CORRESPONDENCE CONCERNANT L'AGRONOMIA LUSITANA ON DOIT S'ADDRESSER À:

LETTERS AND EXCHANGE CONCERNING AGRONOMIA LUSITANA TO BE ADDRESSED TO:

ESTAÇÃO AGRONÓMICA NACIONAL

SACAVÉM

PORTUGAL